

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 05 October 2000 (05.10.00)	
International application No.: PCT/JP00/02076	Applicant's or agent's file reference: A01112M
International filing date: 31 March 2000 (31.03.00)	Priority date: 31 March 1999 (31.03.99)
Applicant: HOLMGREN, Arne et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

31 March 2000 (31.03.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

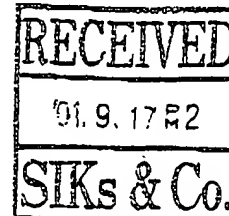
PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi
KRF Building
5th floor
5-5, Kyobashi 1-chome
Chuo-ku
Tokyo 104-0031
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 30 August 2001 (30.08.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference A01112M	
International application No. PCT/JP00/02076	International filing date (day/month/year) 31 March 2000 (31.03.00)
Applicant DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al	

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP, AT, AU, CA, CH, CN, CZ, FI, NO, NZ, PL, RO, RU, SK, US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP, EA, AE, AG, AL, AM, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CR, CU, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, PT, SD, SE, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, OA

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rul 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Eliott PERETTI
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference A01112M	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/02076	International filing date (day/month/year) 31 March 2000 (31.03.00)	Priority date (day/month/year) 31 March 1999 (31.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07C 39/02, A61K 31/166, A61P 39/06, B01J 31/12, C07B 31/00, C09K 15/32, C12N 9/00, 9/04		
Applicant DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u> </u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 31 March 2000 (31.03.00)	Date of completion of this report 14 March 2001 (14.03.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02076

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02076

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	4-11	YES
	Claims	1-3	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Function of Thioredoxin Reductase as a Peroxynitrite Reductase Using Selenocystine or Ebselen (Gavin E. Arteel et al.), Chem. Res. Toxicol., 1999, Vol. 12, No. 3, pages 264-269

Document 2: US, 4618669, A (A. Nattermann & Cie GmbH), 21 October, 1986 (21.10.86), columns 1-6

Document 3: US, 4730053, A (A. Nattermann & Cie GmbH), 8 March, 1988 (08.03.88), columns 1-6

Claims 1-3

The subject matters of claims 1-3 do not appear to be novel in view of document 1 cited in the ISR.

Document 1 describes that an organic selenium compound is used as a substrate of thioredoxin reductase.

Claims 1-11

The subject matters of claims 1-11 do not appear to involve an inventive step in view of document 1 cited in the ISR.

Since document 1 describes that an organic selenium compound promotes the activity of thioredoxin reductase, a person skilled in the art could have easily used it as a peroxidase activity potentiating agent.

Claims 10 and 11

The subject matters of claims 10 and 11 do not appear to involve an inventive step in view of documents 2 and 3 cited in the ISR.

Since documents 2 and 3 describe that an organic selenium compound acts to reduce a peroxide, a person skilled in the art could have easily used the compound for in vivo reduction or hyperoxidation prevention.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi
KRF Building
5th floor
5-5, Kyobashi 1-chome
Chuo-ku
Tokyo 104-0031
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 26 April 2000 (26.04.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference A01112M	International application No. PCT/JP00/02076

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (for all designated States except US)
HOLMGREN, Arne et al (for US)

International filing date : 31 March 2000 (31.03.00)
Priority date(s) claimed : 31 March 1999 (31.03.99)
08 April 1999 (08.04.99)

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 14 April 2000 (14.04.00)

List of designated Offices :

AP : GH,GM,KE,LS,MW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW

EA : AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM

EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE

OA : BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG

National : AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,
FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,
MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,
ZA,ZW

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

Shinji IGARASHI
Shinji IGARASHI

Telephone No. (41-22) 338.83.38

Continuation of Form PCT/IB/301

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

Date of mailing (day/month/year) 26 April 2000 (26.04.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference A01112M	International application No. PCT/JP00/02076

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
- ☒ confirmation of precautionary designations
- ☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

PATENT COOPERATION TREATY

WO 00/58281
PCT/JP00/02076

PCT

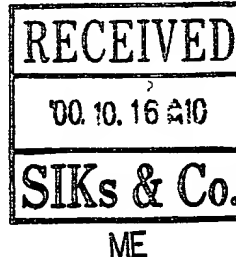
NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi
KRF Building
5th floor
5-5, Kyobashi 1-chome
Chuo-ku
Tokyo 104-0031
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 05 October 2000 (05.10.00)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference A01112M			
International application No. PCT/JP00/02076	International filing date (day/month/year) 31 March 2000 (31.03.00)	Priority date (day/month/year) 31 March 1999 (31.03.99)	
Applicant DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AG,AU,DZ,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,
GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,
NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
05 October 2000 (05.10.00) under No. WO 00/58281

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi
KRF Building
5th floor
5-5, Kyobashi 1-chome
Chuo-ku
Tokyo 104-0031
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 05 October 2000 (05.10.00)		
Applicant's or agent's file reference A01112M		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/JP00/02076	International filing date (day/month/year) 31 March 2000 (31.03.00)	Priority date (day/month/year) 31 March 1999 (31.03.99)
Applicant DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

National : AG, AU, BG, CA, CN, CZ, DE, DZ, IL, JP, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SE, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BR, BY, CH, CR, CU, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MW, MX, PT, SD,
SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

IMAMURA, Masazumi
KRF Building
5th floor
5-5, Kyobashi 1-chome
Chuo-ku
Tokyo 104-0031
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 26 June 2000 (26.06.00)	
Applicant's or agent's file reference A01112M	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/02076	International filing date (day/month/year) 31 March 2000 (31.03.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 31 March 1999 (31.03.99)
Applicant DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
31 Marc 1999 (31.03.99)	11/92789	JP	26 May 2000 (26.05.00)
08 Apri 1999 (08.04.99)	11/101478	JP	26 May 2000 (26.05.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Tessadel PAMPLIEGA

Tdp

Telephone No. (41-22) 338.83.38



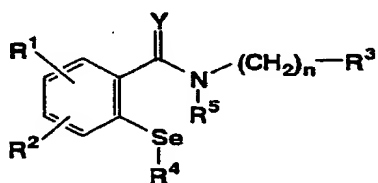
PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

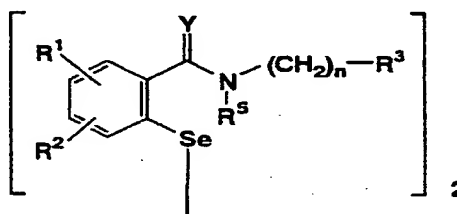
<p>(51) 国際特許分類7 C07C 391/02, A61K 31/166, A61P 39/06, B01J 31/12, C07B 31/00, C09K 15/32, C12N 9/00, 9/04</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/58281</p> <p>(43) 国際公開日 2000年10月5日(05.10.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02076</p> <p>(22) 国際出願日 2000年3月31日(31.03.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/92789 1999年3月31日(31.03.99) JP 特願平11/101478 1999年4月8日(08.04.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 第一製薬株式会社 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒103-8234 東京都中央区日本橋3丁目14番10号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) ホルムグレン アレン(HOLMGREN, Arne)[SE/SE] アミリ マリアン エイチ(AMIRI, Marjan H.)[SE/SE] S-17177 ストックホルム カロリンスカインスティテュート メディカルノベルインスティテュートフォア バイオケミストリイ内 Stockholm, (SE) 政安裕之(MASAYASU, Hiroyuki)[JP/JP] 〒134-8630 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内 Tokyo, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前の公開; 補正書受領の際には再公開される。</p>

(54)Title: SUBSTRATES FOR THIOREDOXIN REDUCTASE

(54)発明の名称 チオレドキシン・レダクターゼ基質



(1)



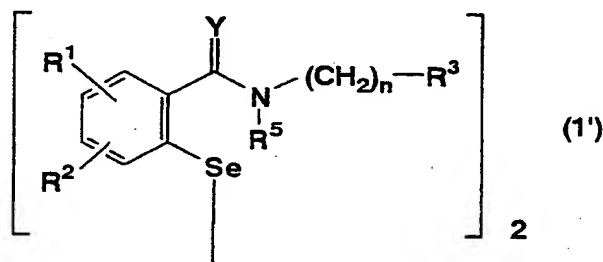
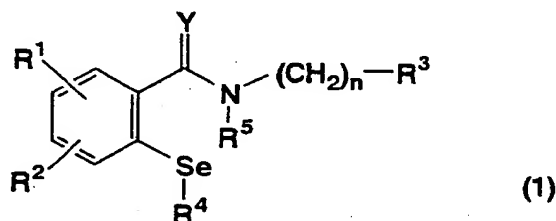
(1')

(57) Abstract

Substrates for thioredoxin reductase, containing compounds represented by general formula (1) or (1') (such as 2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one or open-ring derivatives thereof) (wherein R¹ and R² are each hydrogen, halogeno, trifluoromethyl, or the like; R³ is aryl, an aromatic heterocyclic group, or the like; R⁴ is hydrogen, hydroxyl, an -S-α-amino acid group, or the like; R⁵ is hydrogen or C₁-C₆ alkyl; Y is oxygen or sulfur; and n is an integer of 0 to 5, with the proviso that the selenium atom may be oxidized). These substrates are reduced by thioredoxin reductase in the presence of NADPH and enhance the peroxidase activity of thioredoxin reductase.

(57)要約

以下の一般式 (I) 又は (I') :



(R¹ 及び R² は水素原子、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基などを示し ; R³ はアリール基、芳香族複素環基などを示し ; R⁴ は水素原子、水酸基、-S-α-アミノ酸基などを示し ; R⁵ は水素原子又は炭素数 1~6 のアルキル基を示し ; Y は酸素原子又は硫黄原子を示し ; n は 0~5 の整数を示し ; セレン原子は酸化されていてもよい) で表わされる化合物 (2-フェニル-1,2-ベンゾイソセレナゾール-3(2H)-オン又はその開環体など) を含むチオレドキシンレダクターゼ基質。NADPH の存在下でチオレドキシン・レダクターゼにより還元され、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性を増強する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MZ	モザンビーク	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ベトナム
CN	中国	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KR	韓国	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

明 細 書

チオレドキシン・レダクターゼ基質

技術分野

本発明は、チオレドキシン・レダクターゼの基質、及びチオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性の増強剤に関する。

背景技術

チオール基の酸化還元機構の一つとしてチオレドキシン（以下、本明細書において「TRX」と略す場合がある）－チオレドキシン・レダクターゼ系の存在が知られている。この系はチオール基の可逆的な酸化還元を調節し、生体内のチオールレベルを一定に保つことにより、ジスルフィド結合の形成や過酸化状態の亢進によるチオール蛋白質の機能低下を防止している。

チオレドキシン・レダクターゼは NADPH とチオレドキシンの存在下で標的蛋白質のジスルフィド結合を還元開裂させる活性を有しており、その他にも非常に多岐にわたる生理作用を担っていることが解明されている。チオレドキシン・レダクターゼの基質となるチオレドキシンは、セレノシステインを含有し、2分子のチオール基を分子内に持つ蛋白であり、リボヌクレオチドレダクターゼがリボヌクレオチドを還元する際のプロトン供与体としても作用している。

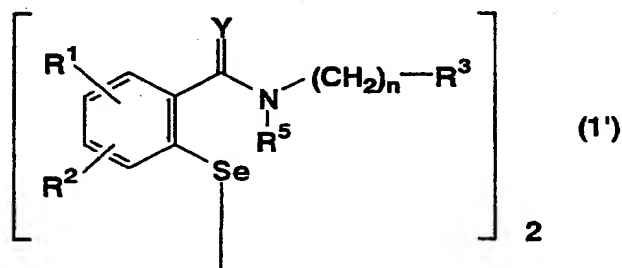
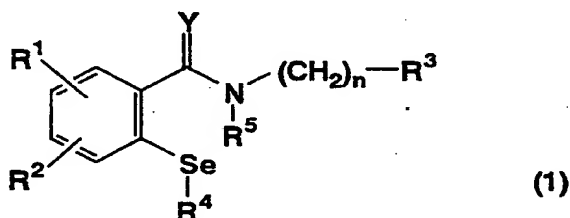
発明の開示

本発明の課題は、チオレドキシン・レダクターゼの基質として作用し、チオレドキシン－チオレドキシン・レダクターゼ系を活性化できる物質を提供することにある。特に、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性を増強することができる物質を提供することが本発明の課題である。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、2-フェニル-1,2-

ベンゾイソセレナゾール-3(2H)-オンなどのセレン化合物がチオレドキシン・レダクターゼの基質となり、それ自身が酸化－還元を繰り返してチオレドキシン－チオレドキシン・レダクターゼ系におけるチオレドキシンと同様に作用できること、並びにこの物質が、チオレドキシン・レダクターゼ及びチオレドキシンの共存下においてチオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性を顕著に増強できることを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。なお、上記物質についてはグルタチオンペルキシダーゼ様作用により過酸化物(活性酸素)を還元しうることは知られているが(Muller, A. et al., Biochem. Pharmacol., 33, pp.3235-3239)、グルタチオンペルオキシダーゼによる過酸化物の還元作用とチオレドキシン・レダクターゼを介した過酸化物の還元作用とは全く別異の機序に基づくものである。

すなわち、本発明は、以下の一般式 (I) 又は (I') :



(式中、 R^1 及び R^2 は、それぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、ニトロ基、炭素数 1~6 のアルキル基、又は炭素数 1~6 のアルコキシル基を示し、 R^1 及び R^2 が一緒になってメチレンジオキシ基を形成してもよく； R^3 はアリール基、芳香族複素環基、5~7 員のシクロアルキル基、又は 5~7 員のシク

ロアルケニル基を示し、該アリール基、該芳香族複素環基、該シクロアルキル基、及び該シクロアルケニル基は 1 個又は 2 個以上の置換基を有していてもよく、 R^4 は水素原子、水酸基、 $-S-$ グルタチオン基、 $-S-\alpha-$ アミノ酸基、又はアリール部分に 1 個又は 2 個以上の置換基を有していてもよいアルキル基を示し、 R^5 は水素原子又は炭素数 1~6 のアルキル基を示し、 R^4 及び R^5 は一緒になって単結合を形成してもよく、 Y は酸素原子又は硫黄原子を示し、 n は 0~5 の整数を示し、セレン原子は酸化されていてもよい。

で表わされる化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含むチオレドキシン・レダクターゼ基質を提供するものである。

上記発明の好ましい態様によれば、2-フェニル-1,2-ベンゾイソセレナール-3(2H)-オン又はその開環体及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む上記のチオレドキシン・レダクターゼ基質；及び、NADPH の存在下でチオレドキシン・レダクターゼにより還元される上記のチオレドキシン・レダクターゼ基質が提供される。

別の観点からは、上記の一般式 (I) 又は (I') 化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性の増強剤が提供され、その好ましい態様として、2-フェニル-1,2-ベンゾイソセレナール-3(2H)-オン又はその開環体及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む上記の活性増強剤が提供される。

さらに別の観点からは、上記の一般式 (I) 又は (I') 化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシンを酸化する触媒；上記の物質を含む、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシンを酸化

することにより過酸化物を還元する作用を有する還元剤；及び、上記の物質を含む、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシンを酸化することにより生体内物質の過酸化を防止する抗酸化剤が提供される。

また、上記基質、上記チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性の増強剤、上記触媒、上記還元剤、及び上記抗酸化剤としての上記の一般式 (I) 又は (I') 化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質の使用、及び上記基質、上記チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性の増強剤、上記触媒、上記還元剤、及び上記抗酸化剤の製造のための上記の一般式 (I) 又は (I') 化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質の使用が本発明により提供される。

これらの発明に加えて、生体内においてチオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性を増強する方法であって、上記の一般式 (I) 又は (I') 化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法；生体内において過酸化物を還元する方法であって、上記物質の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法；及び生体内において生体内物質の過酸化を防止する方法であって、上記物質の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法が提供される。

図面の簡単な説明

第1図は、ヒトチオレドキシン・レダクターゼによる化合物A(2-フェニル-1,2-ベンズイソセレンゾール-3(2H)-オン、「エブセレン」)の還元作用を示す。

第2図は、チオレドキシン・レダクターゼによる化合物Aの還元作用を示す。(A)は低濃度チオレドキシン・レダクターゼによる化合物Aの還元を示し、(B)は化合物Aをチオレドキシン・レダクターゼにより10分間還元した後の、DTNBに

よるセレノール基生成の検出結果を示す。図中、Ebselen は化合物 A を意味する。

第 3 図は、チオレドキシン・レダクターゼによる化合物 A の還元作用に対するヒトチオレドキシンの影響を示す。

第 4 図は、蛍光分光光度法による大腸菌 Trx-(SH)₂ の化合物 A による酸化 (図 A) 及び 0.1 μ M Trx-(SH)₂ と 0.1 μ M の化合物 A を混合した後の 340 nm における蛍光発光の減衰率を示す。図中、Trx はチオレドキシン、EbSe は化合物 A を示す。

第 5 図は、トチオレドキシン・レダクターゼによる過酸化水素の還元と化合物 A 及びチオレドキシンの作用を示す。図中、Trx はチオレドキシン、EbSe は化合物 A、TrxR はチオレドキシン・レダクターゼを示す。

第 6 図は、チオレドキシン・レダクターゼによる過酸化水素の還元反応に及ぼすチオレドキシンと化合物 A の作用を示す。図中、Trx はチオレドキシン、EbSe は化合物 A を示す。

第 7 図は、チオレドキシン・レダクターゼの化合物 A への作用に及ぼす過酸化水素の濃度の影響を示す。図中、Trx はチオレドキシン、TrxR はチオレドキシン・レダクターゼ、EbSe は化合物 A を示す。

第 8 図は、過酸化水素の還元反応に対する化合物 A の作用を示した図である。図中、Ebselen は化合物 A を意味する。

発明を実施するための最良の形態

R¹ 及び R² が示す炭素数 1~6 個のアルキル基としては、直鎖又は分枝鎖のいずれでもよい。例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基などを挙げることができる。R¹ 及び R² が示す炭素数 1~6 個のアルコキシ基としては、直鎖又は分枝鎖のいずれでもよく、例えば、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、n-ブトキシ基、sec-ブトキシ基、tert-ブトキシ基、n-ペントキシ基、n-ヘキソキシ基などを挙げることができる。

R^3 が示すアリール基としては、例えば、炭素数 6~14 個、好ましくは炭素数 6~10 個の単環性ないし 3 環性、好ましくは単環性又は 2 環性のアリール基を用いることができる。具体的には、フェニル基又はナフチル基などが好適である。 R^3 が示す芳香族複素環基としては、窒素原子、酸素原子、イオウ原子などのヘテロ原子を 1 個又は 2 個以上含む、例えば、単環性ないし 3 環性、好ましくは単環性又は 2 環性の芳香族複素環基を用いることができる。2 個以上のヘテロ原子を含む場合には、それらは同一でも異なってもよい。例えば、チエニル基、フリル基、ピロリル基、イミダゾリル基、ピラゾリル基、イソオキサゾリル基、ピリジル基、ピラジニル基、ピリミジニル基、ピリダジニル基、インドリジニル基、イソインドリル基、インドリル基、イソキノリル基、キノリル基、フタラジニル基、ナフチリジニル基、キノキサリニル基、キナゾリニル基、シンノリニル基、プテリジニル基、カルバゾリル基、アクリジニル基、フェナンスリジニル基、フェノチアジニル基などを挙げるができる。

R^3 が示すアリール基、芳香族複素環基、5~7 員環のシクロアルキル基、又は 5~7 員環のシクロアルケニル基は、その環上に 1 個又は 2 個以上の置換基を有していてもよい。2 個以上の置換基を有する場合には、それらは同一でも異なってもよい。置換基の存在位置は特に限定されず、環上の任意の位置に存在することができる。置換基の種類も特に限定されないが、例えば、 C_1 - C_6 アルキル基、 C_2 - C_6 アルケニル基、 C_2 - C_6 アルキニル基、 C_6 - C_{14} アリール基、複素環基（本明細書において複素環という場合には、芳香族複素環のほか、部分飽和又は飽和の複素環を包含する）、ハロゲン原子（本明細書においてハロゲン原子という場合には、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよい）、ヒドロキシ基、オキソ基、アミノ基、アンモニウム基、イミノ基、メルカプト基、チオキソ基、シアノ基、ニトロ基、カルボキシ基、リン酸基、スルホ基、ヒドラジノ基、 C_1 - C_6 ウレイド基、 C_1 - C_6 イミド基、イソチオシアナート基、イソシアナート基、 C_1 - C_6 アルコキシ基、 C_1 - C_6 アルキルチオ基、 C_6 - C_{14} アリールオキシ基、複素環オキシ基、 C_6 - C_{14} アリールチオ基、複素環チオ基、 C_7 - C_{15} アラルキル基、複素環アルキ

ル基、 C_7-C_{15} アラルキルオキシ基、複素環アルキルオキシ基、 C_1-C_6 アルコキシカルボニル基、 C_6-C_{14} アリールオキシカルボニル基、複素環オキシカルボニル基、 C_2-C_7 アルキルカルボニル基、 C_6-C_{14} アリールカルボニル基、複素環カルボニル基、 C_2-C_7 アルキルカルボニルオキシ基、 C_6-C_{14} アリールカルボニルオキシ基、複素環カルボニルオキシ基、 C_2-C_8 アルキルカルボニルアミノ基、 C_1-C_6 スルホニル基、 C_1-C_6 スルフィニル基、 C_1-C_6 スルホニルアミノ基、 C_1-C_6 カルバモイル基、又は C_2-C_6 スルファモイル基などを挙げることができる。

さらに、上記に例示した置換基は、さらに 1 又は 2 個以上の他の置換基で置換されていてもよい。このような例として、例えば、ヒドロキシ C_1-C_6 アルキル基、ハロゲン化 C_1-C_6 アルキル基、モノ若しくはジ C_1-C_6 アルキルアミノ基、ハロゲン化 C_1-C_6 アルキルカルボニル基、ハロゲン化 C_6-C_{14} アリール基、ヒドロキシ C_6-C_{14} アリール基、モノ又はジ C_1-C_6 アルキルカルバモイル基などを挙げることができる。もっとも、上記に説明した置換基は例示のためのものであり、これらに限定されることはない。

R^4 が示す $-S-\alpha$ -アミノ酸基の種類は特に限定されないが、チオール基含有のアミノ酸の残基であることが好ましく、 $-S-\alpha$ -アミノ酸基は蛋白質又はペプチド化合物を構成するアミノ酸の残基であってもよい。蛋白質又はペプチド化合物としては、生理的に許容されるものであればその種類は限定されないが、例えば、アルブミン、グロブリン等の血清中の蛋白質を用いることが好ましい。血清中の蛋白質のうちアルブミンがより好ましく、ヒトアルブミンが特に好ましい。 R^4 が示すアリール部分に 1 個又は 2 個以上の置換基を有していてもよいアラルキル基としては、ベンジル基、パラヒドロキシベンジル基、2,4-ジヒドロベンジル基などを挙げることができる。 R^4 及び R^5 は一緒になって単結合を形成してもよく、その場合には、 R^5 が結合する窒素原子とセレン原子とを含む 5 員環が形成される。 R^5 が示す炭素数 1~6 のアルキル基としては、上記に例示したものをを用いることができる。

本発明のチオレドキシシ・レダクターゼ基質としては、上記式 (1) 又は式 (1')

で表される化合物の生理学的に許容される塩を用いてもよい。生理学的に許容される塩は当業者に適宜選択可能である。また、遊離形態の化合物又は生理学的に許容される塩の水和物を用いることもできる。なお、上記式(1)又は(1')で表される化合物は1個又は2個以上の不斉炭素を有する場合があるが、光学異性体、ジアステロ異性体などの立体異性体、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などを本発明の基質として用いてもよい。

本発明の基質として、例えば、2-フェニル-1,2-ベンズイソセレンアゾール-3(2H)-オン(一般名では「エブセレン(ebselen)」と呼ばれる。)又はS-(2-フェニルカルバモイル-フェニルセレニル)-アルブミンなどを挙げることができ、これらの化合物の生理学的に許容される塩又は水和物も本発明の基質として好ましい。2-フェニル-1,2-ベンズイソセレンアゾール-3(2H)-オンの製造方法は、特公平 2-38591号公報に開示されており、S-(2-フェニルカルバモイル-フェニルセレニル)-アルブミンの製造方法は特開平 7-233056号公報に開示されている。従って、これらの製造方法を参照することにより、当業者は上記式(1)又は式(1')に包含される任意の化合物を容易に製造することが可能である。

上記式(1)又は式(1')で表わされる本発明の基質は、チオレドキシシン・レダクターゼにより還元され、チオレドキシシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性を増強することができる。また、本発明の基質は、チオレドキシシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシシンを酸化する触媒として作用することができ、チオレドキシシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシシンを酸化することにより過酸化物を還元する還元剤としても作用することができる。さらに、チオレドキシシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシシンを酸化することにより生体内物質の過酸化を防止する抗酸化剤としても作用できる。

従って、本発明の基質を医薬としてヒトを含む哺乳類動物に投与することにより、生体内のチオレドキシシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応を増強することができ、その結果、生体内物質の過酸化を防止し、あるいは生体内の過酸化

物を還元することができ、生体内のチオール蛋白やチオール化合物の酸化-還元状態の恒常性を保つことができる。本発明の基質を有効成分として含む医薬は、例えば、細胞内酸化還元調節の異常に起因し、細胞内酸化還元調節の異常を伴う疾患の予防及び／又は治療に有用である (Mattson, M.P. et al., Nature, 382, pp.674-675, 1996)。このような疾患として、例えば、虚血性臓器疾患 (脳、心臓、肝臓、腎臓、消化器等)、不適切なアポトーシス誘発による神経退行性疾患 (アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞蹈病、家族性筋萎縮性側索硬化症[ALS]、エイズ等) や放射線障害、悪性腫瘍 (白血病など)、及び各種炎症性疾患やエンドキシンショック等を挙げることができる。

いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、酸化ストレスと虚血性臓器疾患や各種炎症及びエンドトキシンショックとの関連性が認められており、これら虚血性臓器疾患に不適切なアポトーシス誘発の関与が近年確認されている (Hockenbery, D.M. et al., Cell, 75, pp.241-251, 1993)。アポトーシス惹起の過程においては、種々の要因による細胞内過酸化物質 (活性酸素)、特に過酸化水素の生成により細胞内核蛋白転写因子 NF- κ B の活性化、すなわち抑制蛋白質 I κ B の NF κ B よりの離脱がもたらされ、プログラムされた細胞死 (アポトーシス) が引き起こされることが知られている (Frank, J.T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87, pp.9943-9947, 1990)。

これら NF- κ B は、チオレドキシンによるレドックス制御も受けている (Hayashi, T. et al., Biol. Chem., 268, pp.11380-11388, 1993)。通常、NF- κ B の SH 基は I κ B と結合した不活性型状態では S-S 結合を形成しており、I κ B が障害となってチオレドキシンは近づけない。このため、刺激により活性化されて I κ B が遊離しても、酸化型 NF- κ B は DNA に結合することができないが、チオレドキシンが NF- κ B の S-S 結合を還元して活性化型 NF- κ B となると、これが核内に移行して DNA に結合し、遺伝子を活性化してアポトーシスや各種炎症反応が惹起される。従って、本発明の基質は、Trx による還元反応の抑制に関与すると考えられる。

本発明の基質を医薬として用いる場合には、上記式 (1) 又は式 (1') で表さ

れる化合物及び生理学的に許容されるその塩、並びにそれらの水和物からなる群から選ばれる物質をそのまま投与してもよいが、一般的には、有効成分である上記物質と製剤用添加物とを含む医薬組成物を製造して投与することが望ましい。製剤用添加物としては、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、溶解剤等を用いることができ、2種以上の製剤用添加物を組み合わせて用いることもできる。医薬組成物の形態は特に限定されないが、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤などの経口投与用組成物、注射剤、点滴剤、坐剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤、クリーム剤、軟膏剤、点鼻剤、点眼剤、点耳剤、貼付剤などの非経口投与用組成物を挙げることができる。これらの医薬組成物は当業界で汎用の方法により製造することが可能である。

上記医薬の投与量は、適用すべき疾患の種類、患者の年齢や体重、疾患の重篤度などの条件に応じて、適宜選択することが可能である。例えば、経口投与の場合、成人一日あたり 0.05～5,000mg（有効成分量として）の範囲である。2-フェニル-1,2-ベンズイソセレナゾール-3(2H)-オンを有効成分として含む医薬を用いる場合には、その投与量は、経口投与の場合、成人一日あたり 100～2,000mg（有効成分量として）であり、好ましくは、200～1,000mg の範囲である。もっとも、上記の投与量は上記の条件に応じて適宜増減することができる。

実施例

以下、本発明を実施例により説明するが、本発明は下記の実施例に限定されることはない。以下の実施例中、化合物 A は 2-フェニル-1,2-ベンズイソセレナゾール-3(2H)-オン（図中、Ebselen と記する場合がある）を示す。

例 1：製剤例

（錠剤）

化合物 A	50 mg
カルボキシメチルセルロース	25 mg

でんぶん	5 mg
結晶セルロース	40 mg
ステアリン酸マグネシウム	2 mg
計	122 mg

例 2 : 試験例

(A)材料と方法

(1)材料および酵素

NADPH と DTNB はシグマ社、過酸化水素(30%)とジメチルスルホキシドはメルク社の製品を用いた。子牛胸腺由来又はヒト胎盤由来のチオレドキシン・レダクターゼ (TrxR) はラットの肝酵素用に報告されているものに準じて精製し、均質化したものを用いた(活性度:酵素 1 mg あたり毎分 25 μ mol の NADPH を酸化する)。大腸菌由来のチオレドキシン(Trx)は均質化処理したものを用い、ヒトリコンビナントチオレドキシンおよび突然変異菌 C62S/C72S はレンらの方法で調製した。化合物 A は実験前にジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。

(2)分光光度法による測定

化合物 A の存在下での酵素活性は、セミマイクロ石英キュベットにサンプルを加え、自動サンプルエクステンジャーとレコーダー付き PMQ3 分光光度計 (ツァイス社) で室温で測定した。

(3)酵素アッセイ

チオレドキシン・レダクターゼ活性の測定は、TE 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) に 100 μ M の NADPH と所定量の化合物 A を加えて行なった。チオレドキシン・レダクターゼのストック溶液 5~10 μ l を上記混合物に加え、最終液量 0.55 ml として反応を行った。比較用試料のキュベットには測定試料と同量の DMSO とチオレドキシン・レダクターゼを加え、比較用キュベットの吸光度を自動的に吸光度計で差し引いた。反応の進行は 340 nm で追跡した。

チオレドキシン・レダクターゼの活性はインスリン定量法で行なった。100 mM

リン酸カリウム(pH 7.0)、2 mM NADPH、及び 0.16 mM インスリンを混合し、化合物 A 及びチオレドキシンを加え、最後にチオレドキシン・レダクターゼを加えて総液量 0.55 ml として反応を行なった。インスリンジスルフィドの還元反応の進行は 340 nm で追跡した。生成した硫化水素基又はセレノール基は、6 M グアニジン-HCl、0.20 M Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM DTNB の混合液 0.50 ml を加えて 412 nm で測定し、 $13,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ のモル吸光係数を用いて算出した。NADPH を用いたチオレドキシン・レダクターゼの DTNB 還元活性は、10 mM EDTA、0.2 mM NADPH、5 mM DTNB、及び 0.1 mg/ml のウシ血清アルブミンを含む 100 mM リン酸カリウム(pH 7.0) 溶液中で 412 nm で測定した。

(4) NADPH の酸化で生成したセレノール基の算出

化合物 A は 340 nm でモル吸光係数 $4,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ の吸光度を示す。またジチオールによるセレノール還元化合物である N-フェニル-2-カルボキシアミドベンゼンセレノールは 340 nm で半分の吸光度 ($2,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を示す。過剰の DTT の存在下又は非存在下において化合物 A-セレノールが生成することを吸光度曲線から確認した。化合物 A-セレノールの生成量算定では、NADPH の酸化により生ずる NADP^+ が $6,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ のモル吸光係数を有するので、 $8,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ のモル吸光係数を用いた。

(5) 蛍光測定

蛋白の蛍光測定は自動温度調節 SPEX-Fluoro Max 計で行なった。Trx-(SH)₂ は大腸菌由来の Trx-S₂ 640 μM を室温で 10 mM DTT と共に 20 分間インキュベートし調製し、その後、DTT をゲルクロマトグラフィーで除いた (N₂ 平衡緩衝液を NAP-5 カラム (ファルマシア製) に通した)。Trx-(SH)₂ は 0.1 M 燐酸カリウムと 1 mM EDTA の 3 ml 混合液(pH 7.5)中に溶解した化合物 A と混合し、直ちに 22°C で蛍光分光光度計により測定した。波長 290 nm で蛍光励起した後、波長 300 から 500 nm の範囲で発光スペクトルを記録した。340 nm での蛍光を用いて Trx-(SH)₂ の酸化反応速度を追跡して反応速度を記録した。

(B) 結果

(1) ヒトチオレドキシン・レダクターゼによる化合物Aの還元

化合物A 50 μ M 又は 100 μ M と NADPH (100 μ M) とを加えたキュベットに純粋なヒトレドキシンレダクターゼ (40 nM 又は 4.5 μ g/ml) を加えると、340 nm の吸光度が急激に減少し、化合物Aがヒトチオレドキシン・レダクターゼの基質となることが確認された。図1に結果を示す。50 μ M (●) 又は 100 μ M (□) の化合物Aを 50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA (pH 7.5)、100 μ M NADPH を含む溶液 0.55 ml に加え、40 nM ヒトチオレドキシン・レダクターゼと混合した。340 nm での吸光度を測定し、ブランク (化合物Aのみを除外し他の酵素を同量含む) 値で補正した。同様の実験を 17 nM の酵素に化合物A 50 μ M (●) 及び 100 μ M (△) を混合して行った。

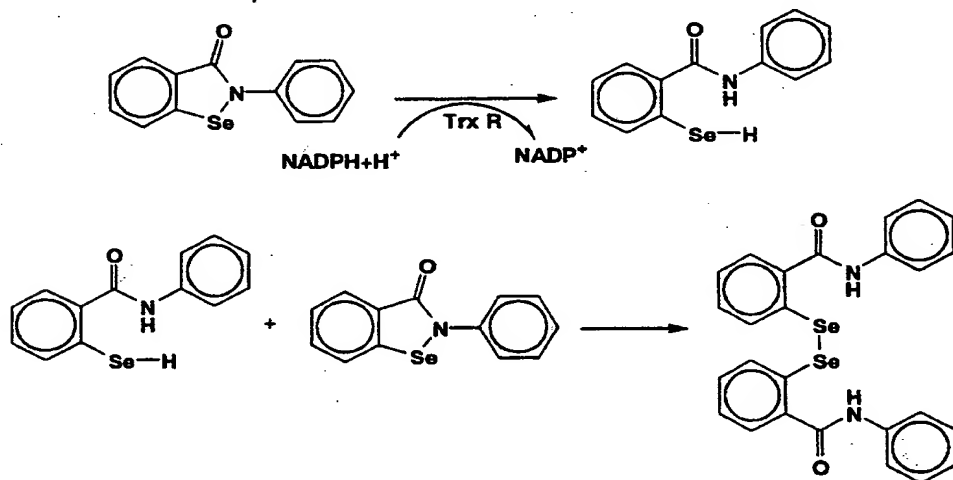
化合物A 50 μ M では反応が1分で完了し、この反応が速いことが認められた。その後、非常にゆっくり 340 nm での吸光度が減少したが、これは化合物Aがセレナイト、セレノシステイン等の他のセレン化合物と異なり酸素と酸化還元サイクルをしないことを示している。DTNB を含む 6 M グアニジン HCl を7分後にキュベットに加えたところ、412 nm における吸光度が 0.400 となり、セレノール基の生成が確認された。化合物A自身は DTNB と反応しなかった。化合物A 100 μ M を添加した時の反応速度は酵素を 40 nM 用いた場合の 340 nm 吸光度から見て遅いように思われた。

より低い濃度の酵素で実験によると、酵素 17 nM、化合物A 100 μ M の場合に見られるように 340 nm での吸光度は複雑な変化を示した (図1)。340 nm の吸光度は初期に減少した後増加し、その後減少して 15 分後には酵素 40 nM 添加の場合と同じ値を示した。酵素 7.5 nM を添加し、化合物Aの量を 10、20、50、100 μ M に変化させた場合の結果を図2に示す。図2 Aには低濃度でのチオレドキシン・レダクターゼによる化合物Aの還元作用を示す。50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA (pH 7.5)、100 μ M NADPH を含む溶液 0.55 ml を入れたキュベットに化合物A 10 μ M (●)、20 μ M (△)、50 μ M (□)、100 μ M (■) を添加した。TrxR 7.5 nM を上記4サンプルに添加した。時刻ゼロにおける化合物Aを含まないブランクの 340 nm での吸

光度の低下は、NADPH が $10\mu\text{M}$ の化合物 A で酸化されたことを示す。 $50\mu\text{M}$ 及び $100\mu\text{M}$ の化合物 A を含むキュベットは 340 nm での吸光度の増加を示した。また、可視的沈殿生成により NADPH の酸化反応が防止された。

図 2 B には、化合物 A をチオレドキシン・レダクターゼにより 10 分間還元した後の DTNB によるセレノール基生成の検出結果を示す。上記図 2 A と同様の実験を 10 分間反復した。 6 M グアニジン-HCl、 0.20 M Tris-HCl (pH 8.0)、 1 mM DTNB の混合液 0.5 ml を添加して反応を停止し、 412 nm での吸光度を測定し、ブランクを差し引いてセレノール基の定量を行った。化合物 A が最高濃度 ($50\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$) の時キュベットに沈殿が生じ、 6 M グアニジン HCl と DTNB で反応を停止した時、セレノール様物質がすべてのキュベットに認められたが (図 2 B)、NADPH の酸化と化合物 A のセレノールへの還元により生じる 340 nm 吸光度の低下は、明らかにこの沈殿により防止されていた。

NADPH と酵素による化合物 A の還元はイソセレナゾロン環が開環した結合中間体を経て、セレノールを生成する反応と考えられる (下記スキーム)。



この中間体と化合物 A との反応、あるいは酵素に結合した中間体と化合物 A との反応は溶解度の低いジセレニドを生成し、これが沈殿量を増加させ 340 nm 吸光度を高めるものと考えられる。化合物 A $100\mu\text{M}$ と酵素を 4 nM しか含まない沈殿物の入ったキュベットに酵素 40 nM を加えると、このジセレニドはセレノールに還元されて溶液は急速に透明になり、最終的に NADPH 酸化反応が進行したことが

340 nm での吸光度変化として現れるが、この不溶性ジセレニドの生成はこの酵素だけに見られる特別な性質ではない。これは、化学量論的に解析できないような低い濃度 (10 μ M) の DTT と 100 μ M の化合物 A を用いた予備実験で示されたが、一方セレノールは過剰の DTT の存在下でのみ生成することが HPLC でも確認された。

化合物 A の K_m 値および V_{max} 値を求めるため、5、10、20 μ M の化合物 A に対して 15 nM の酵素を用いた。30 秒後、すべてのキュベットで 5 μ M の NADPH が酸化された。その後、ジセレニドの還元を示すと思われる化合物 A の濃度上昇がゆっくり見られた。化合物 A の K_m 値が 5 μ M 未満であることは明らかであり、1000 \pm 300/分の Kcal 値が算出された。ヒト Trx-S₂ が 2.5 nM の K_m 値と 3000/分の Kcal 値を持つことを考えると、化合物 A は非常に珍しく効率のよい基質であると言える。

(b) 哺乳類チオレドキシンの酵素活性に及ぼす化合物 A の影響

化合物 A がチオレドキシンのレダクターゼの作用を阻害するか否かを調べるため、酵素定量試験を行なった。50 μ M 化合物 A と 10 nM 酵素と DTNB を基質として用いたところ、阻害は認められず、また、チオレドキシンのチオレドキシンのレダクターゼを用いたインスリン還元定量試験ではわずかな影響しか認められなかった (表 1)。後者の効果は、酵素と共に化合物 A がインスリンジスルフィドの還元反応の触媒作用をしないため、定量試験では Trx と競合することに由来する。化合物 A と共に酵素をブレインキュベーションすると NADPH の存在下又は非存在下で酵素作用は阻害されなかった。

表 1 に哺乳類チオレドキシンのレダクターゼの酵素活性に対する化合物 A の効果を示す。(A) は、100 nM リン酸カリウム (pH 7.0)、2 mM EDTA、0.2 mM NADPH、0.16 mM インスリン、5 μ M ヒト Trx 及び表示の化合物 A を混合した時の反応の結果を示す。10 nM 子牛胸腺由来のチオレドキシンのレダクターゼを総量 0.55 ml の上記混合液に添加して反応を開始し、340 nm での吸光度を 20°C で 3 分間測定した。その後、6 M グアニジン HCl、0.20 M Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM DTNB を含む混合液を 0.5 ml 加えて反応を停止し、412 nm での吸光度よりインスリン中に

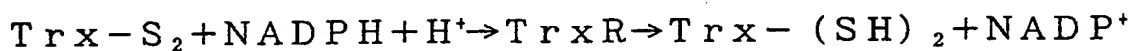
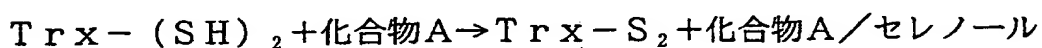
生成した SH 基の量を算出した。(B)では、10 nM 子ウシ胸腺由来のチオレドキシン・レダクターゼを 50 μ M の化合物 A 及び 100 μ M NADPH の存在下又は非存在下で 1 時間ブレインキュベーションした。その後、この液 10 μ l を 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA、5 mM DTNB の混合液 500 μ l に加え、412 nm での活性を求めた。活性は 3 分間に生成した SH 基の量 (μ M) で示した。

表 1

	Trx で触媒されるインスリン ジスルフィドの還元			DTNB の還元	
化合物 A (μ M)	0	5	10	0	50
SH 基 (μ M)	79.8	70.6	68.4	7.3	7.5
活性(%)	100	89	88	100	103

(3) 化合物 A の還元にあぼすチオレドキシンの影響

チオレドキシン・レダクターゼ、NADPH、及び化合物 A にヒトチオレドキシンを加えると反応速度が上昇した。図 3 は、チオレドキシン・レダクターゼによる化合物 A の還元反応に対するヒトチオレドキシンの影響を示した図である。50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA (pH 7.5)、100 μ M NADPH を含む混合液 0.5 ml に 10 nM TrxR を加え、ヒト Trx-S₂ 添加量をゼロ (●)、5 μ M (◆) に変化させて NADPH の酸化反応の進行を記録した。最初の 2 分間には、Trx-S₂ は Trx-(SH)₂ へと還元された。矢印は両方のキュベットに化合物 A を添加したことを示す。この結果は、Trx-(SH)₂ が化合物 A を下記反応式に従って速やかに還元することを示している。



(4) 化合物 A と大腸菌 Trx-(SH)₂ との反応

哺乳類と大腸菌の Trx は GPC という同じ活性部位を持ちジスルフィドとの反応性を有する。大腸菌の Trx-(SH)₂ は Trx-S₂ の 3 倍の強度のトリプトファン蛍光を発するので、これを化合物 A との反応を追跡するのに用いた。0.1 μ M の化合物 A と混合すると 0.1 μ M Trx-(SH)₂ から Trx-S₂ への酸化が起こったことを示すスベ

クトルの変化が認められた。図 4 A は、蛍光分光光度法による大腸菌 Trx-(SH)₂ の化合物 A による酸化を示した図である。N₂ 平衡 0.1 M リン酸カリウム液に大腸菌 Trx-(SH)₂ 0.1 μM (1.2 μg/ml) を加え、1 mM EDTA (pH 7.5) でサンプルを調製した。サンプルの蛍光は波長 290 nm で励起した。波長範囲 300~500 nm で吸光度を記録し、その後、0.1 μM の化合物 A を添加してスペクトルを記録した。図 4 B は 0.1 μM Trx-(SH)₂ と 0.1 μM の化合物 A を混合した後の 340 nm における蛍光発光の減衰率を示した図である。0.1 μM の化合物 A を添加後のデッドタイムに 0.1 μM の Trx-(SH)₂ の相対蛍光発光強度が変化することは、Trx-(SH)₂ の 2×10^7 /M/秒より酸化速度が速いことを示している。これは低分子量化合物による還元型チオレドキシンの酸化反応の中で最も速いものである。

(5) 化合物 A によるチオレドキシシン・レダクターゼの過酸化水素レダクターゼ活性の増強

哺乳類のチオレドキシシン・レダクターゼは過酸化水素を直接還元した。図 5 は、ヒトチオレドキシシン・レダクターゼによる過酸化水素の還元と化合物 A 及びチオレドキシシンの影響を示した図である。50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA (pH 7.5)、100 mM NADPH を含むキュベットに 0.5 mM 過酸化水素、17 nM ヒト TrxR (●)、17 nM ヒト TrxR + 2 μM 化合物 A (△)、17 nM TrxR + 2 μM 化合物 A + 4.5 μM ヒト Trx (□)。過酸化水素を含まない 17 nM チオレドキシシン・レダクターゼだけのブランクの 340 nm での吸光度を測定した。この結果、0.50 mM のヒドロペルオキシドで 30 回/分の回転率と算定された。化合物 A 2 μM を添加することにより、この酵素の活性が刺激され、回転率が 15 倍、すなわち 450 回/分に増大した。さらに 4.5 μM のヒト Trx を加えると、活性は 30 倍、すなわち 900 回/分へと増大した。このように、化合物 A はチオレドキシシン・レダクターゼの過酸化水素レダクターゼ活性（ペルオキシダーゼ活性）を劇的に増大させ、チオレドキシシンペルオキシダーゼ類似の作用を有することが明らかになった。

(6) 高濃度過酸化水素に対する化合物 A およびチオレドキシシンの影響

チオレドキシシン・レダクターゼ 17 nM にチオレドキシシンを 4.5 μM 添加すると過

酸化水素の還元が促進される。図6はチオレドキシン・レダクターゼによる過酸化水素の還元反応に及ぼすチオレドキシンと化合物Aの影響を示した図である。図5と同様の条件で17 nM チオレドキシン・レダクターゼのみ (●)、4.5 μ M Trx 添加 (△) とし、その後 0.5 μ M の化合物Aを加えて最終的に化合物Aの濃度を5.5 μ M とした。低濃度 (0.5 μ M) の化合物Aは反応速度を上昇させ、5.5 μ M ではさらに強力な促進作用が認められた。過酸化水素 (2 mM)、TrxR (17 nM)、ヒト Trx (5 μ M) を用い、1、2、5 μ M の化合物Aを用いた場合には、同じ反応速度、すなわち 23 nM/分の NADPH 酸化速度を得た。このように、これらの条件下では酵素の回転率 1328 回/分、1 nM の化合物Aの回転率 23 回/分であり、非常に高い効率のペルオキシダーゼ系であることが判明した。

(7)低濃度過酸化水素に対する影響

化合物A 2 μ M では17 nM チオレドキシン・レダクターゼのみが100 μ M の過酸化水素に高い活性を示した。図7はTrxRの化合物Aへの活性に対する過酸化水素の濃度の影響を示した図である。17 nM ヒトチオレドキシン・レダクターゼ + 2 μ M 化合物A (●)、17 nM ヒトチオレドキシン・レダクターゼ + 4.5 μ M Trx + 2 μ M 化合物A (△) に表示の濃度の過酸化水素を添加して測定した。このように、化合物Aは生理的に有効な低い濃度でも酵素活性を向上させ、その増加率は約25倍であった。図8は、10 nM チオレドキシン・レダクターゼのみ (●)、又は10 nM チオレドキシン・レダクターゼ + 4.5 μ M ヒト Trx (△) のみを用いた場合における100 μ M 過酸化水素の還元反応に対する化合物Aの影響を示している。活性は340 nmにおける吸光度の毎分当たりの変化率 ΔA_{340} /分で表示した。チオレドキシン依存反応はさらに促進されており、100 μ M 過酸化水素と1、2、5 μ M の化合物Aによって、Trxの存在下又は非存在下でも同じように反応が促進された。

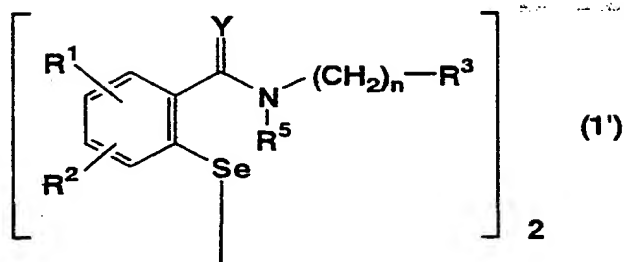
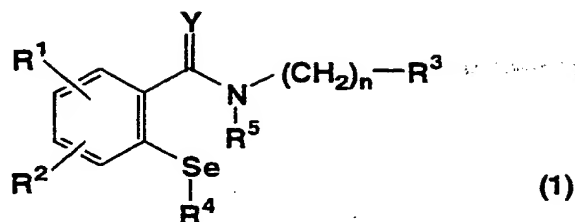
産業上の利用可能性

本発明のチオレドキシン・レダクターゼの基質は、チオレドキシンーチオレド

キシニン・レダクターゼ系を活性化でき、特にチオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性を増強することができる。従って、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシンを酸化することにより生体内物質の過酸化を防止する抗酸化剤などとして有用である。

請求の範囲

1. 以下の一般式 (I) 又は (I'):



(式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、ニトロ基、炭素数 1~6 のアルキル基、又は炭素数 1~6 のアルコキシル基を示し、 R^1 及び R^2 が一緒になってメチレンジオキシ基を形成してもよく； R^3 はアリール基、芳香族複素環基、5~7 員のシクロアルキル基、又は 5~7 員のシクロアルケニル基を示し、該アリール基、該芳香族複素環基、該シクロアルキル基、及び該シクロアルケニル基は 1 個又は 2 個以上の置換基を有していてもよく； R^4 は水素原子、水酸基、-S-グルタチオン基、-S- α -アミノ酸基、又はアリール部分に 1 個又は 2 個以上の置換基を有していてもよいアルキル基を示し； R^5 は水素原子又は炭素数 1~6 のアルキル基を示し、 R^4 及び R^5 は一緒になって単結合を形成してもよく；Y は酸素原子又は硫黄原子を示し；n は 0~5 の整数を示し；セレン原子は酸化されていてもよい)

で表わされる化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含むチオレドキシン・レダク

ターゼ基質。

2. 2-フェニル-1,2-ベンゾイソセレナゾール-3(2H)-オン又はその開環体及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む請求の範囲第1項に記載のチオレドキシン・レダクターゼ基質。

3. NADPH の存在下でチオレドキシン・レダクターゼにより還元される請求の範囲第1項又は第2項に記載のチオレドキシン・レダクターゼ基質。

4. 請求の範囲第1項に記載の一般式(I)又は(I')で表される化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性の増強剤。

5. 2-フェニル-1,2-ベンゾイソセレナゾール-3(2H)-オン又はその開環体及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む、請求の範囲第4項に記載の活性増強剤。

6. 請求の範囲第1項に記載の一般式(I)又は(I')で表される化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシンを酸化する触媒。

7. 請求の範囲第1項に記載の一般式(I)又は(I')で表される化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシンを酸化することにより過酸化物を還元する作用を有する還元剤。

8. 請求の範囲第1項に記載の一般式(I)又は(I')で表される化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシンを酸化することにより生体内物質の過酸化

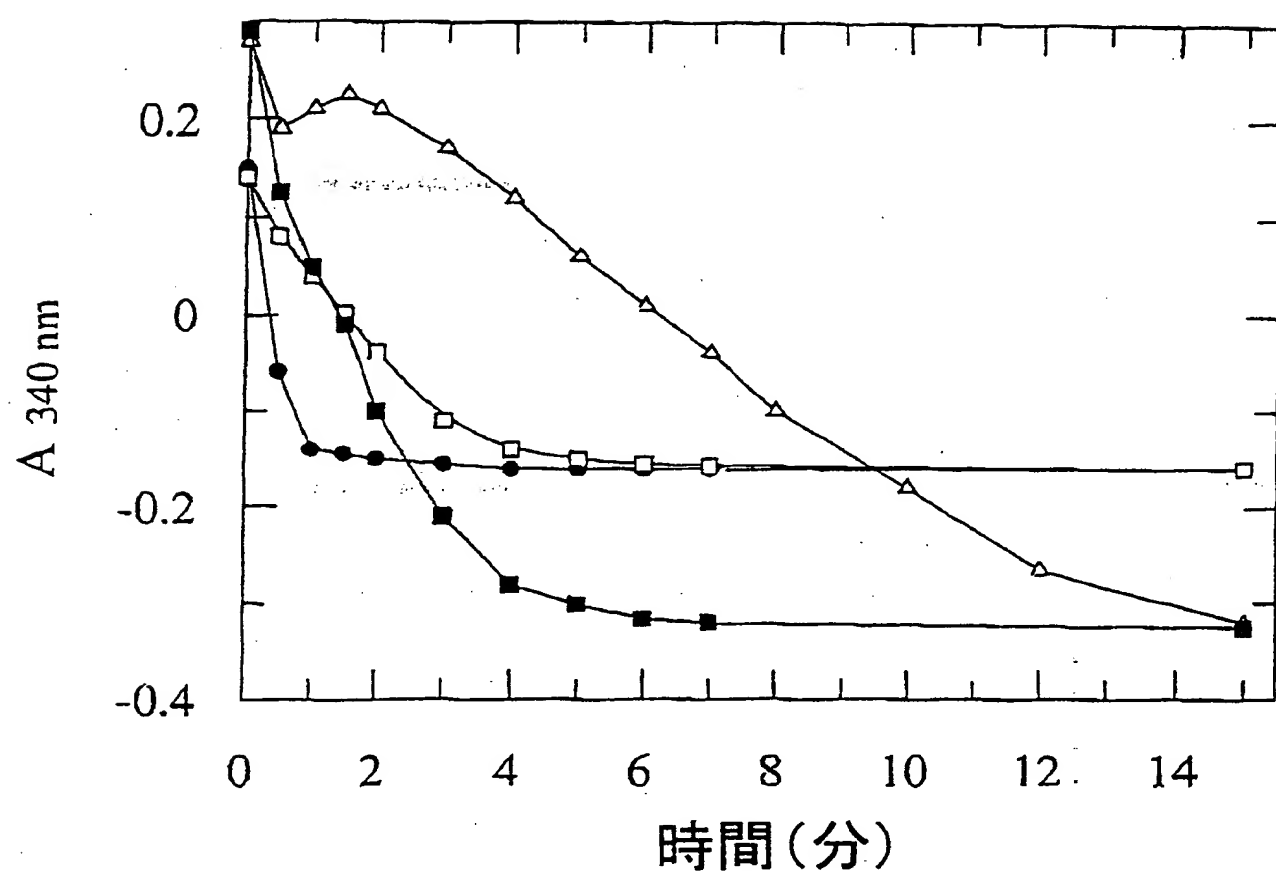
を防止する抗酸化剤。

9. 生体内においてチオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性を増強する方法であって、請求の範囲第1項に記載の一般式(I)又は(I')で表される化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法。

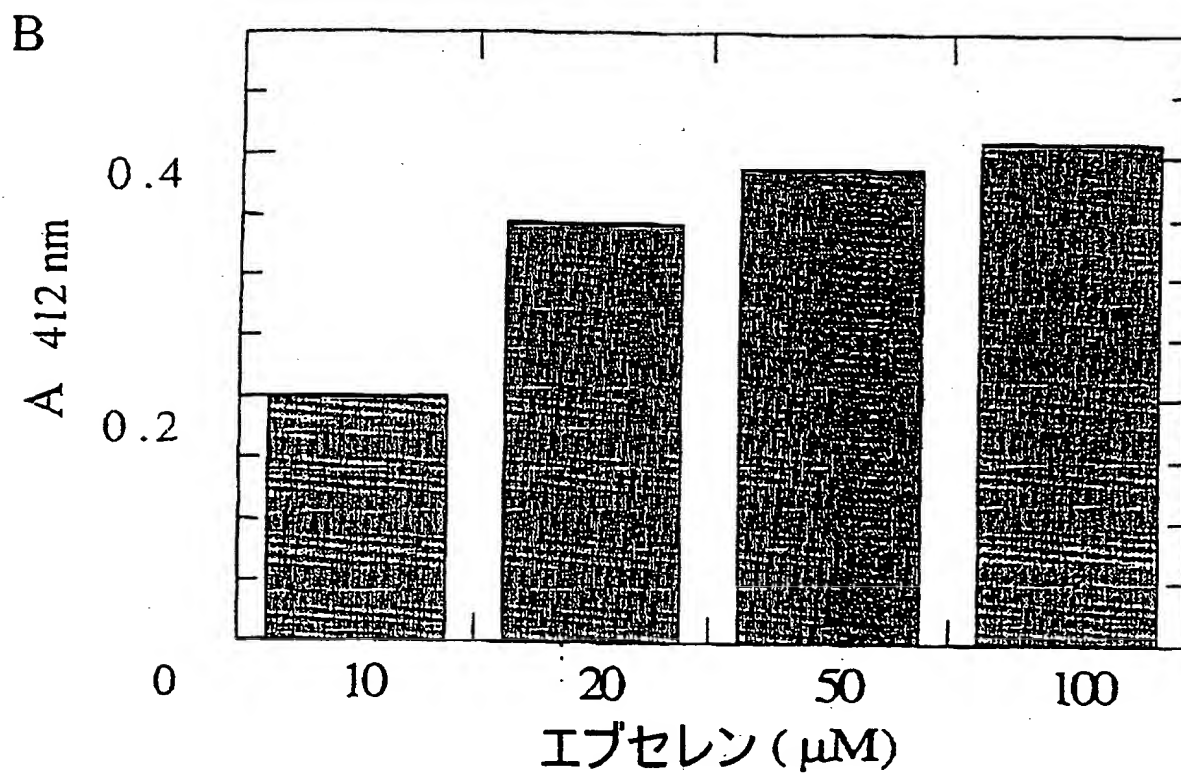
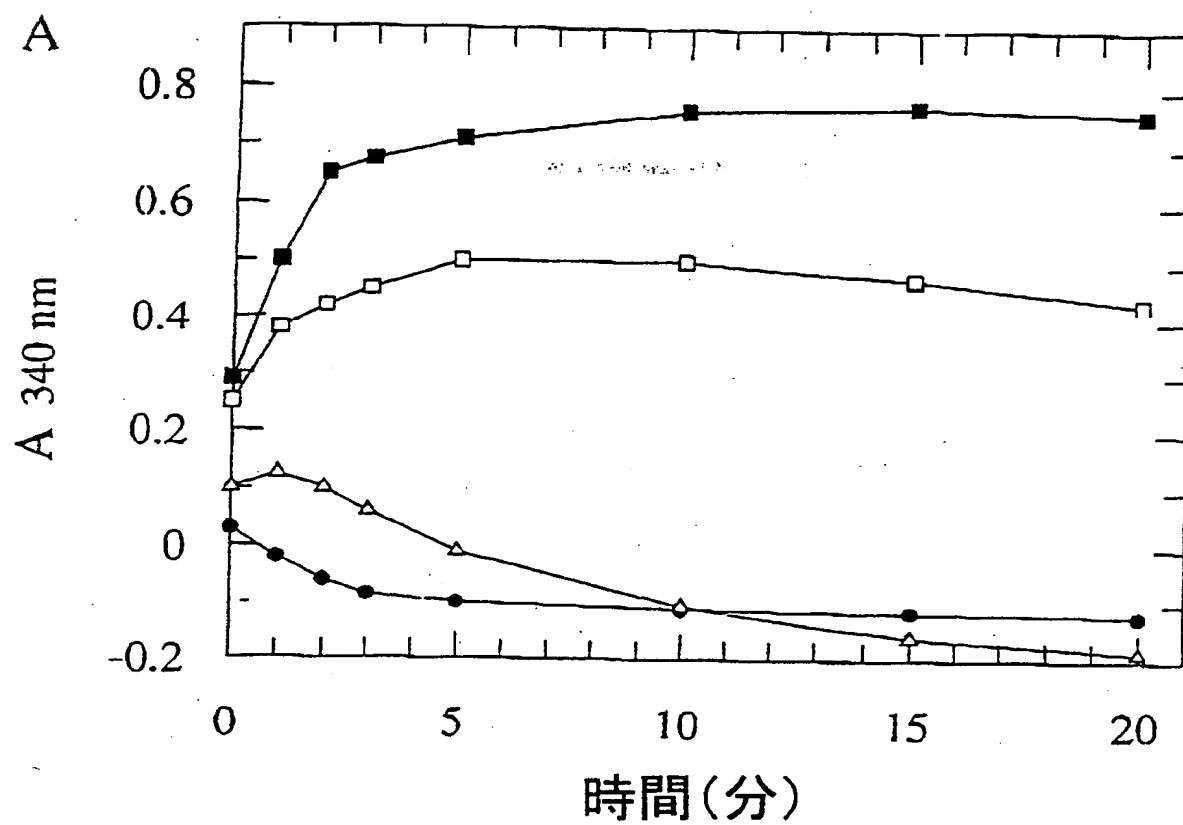
10. 生体内において過酸化物を還元する方法であって、請求の範囲第1項に記載の一般式(I)又は(I')で表される化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法。

11. 生体内において生体内物質の過酸化を防止する方法であって、請求の範囲第1項に記載の一般式(I)又は(I')で表される化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法。

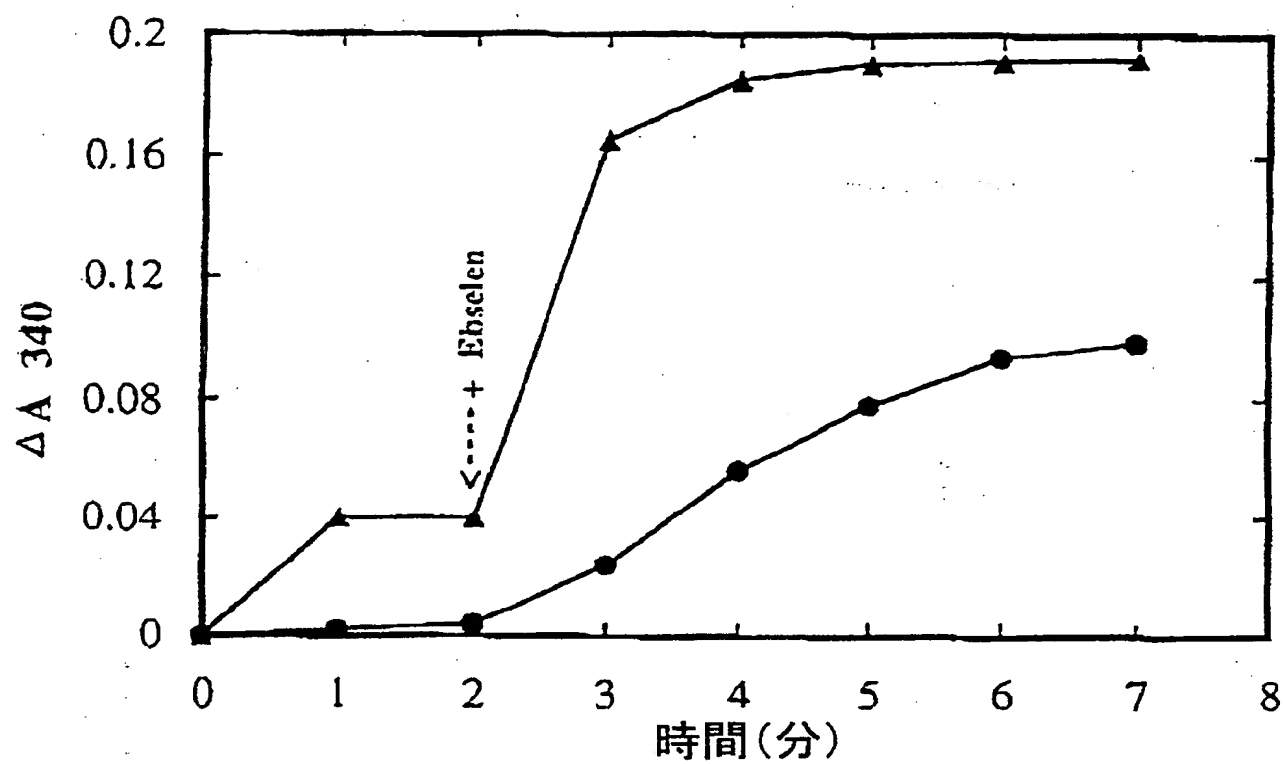
第1図



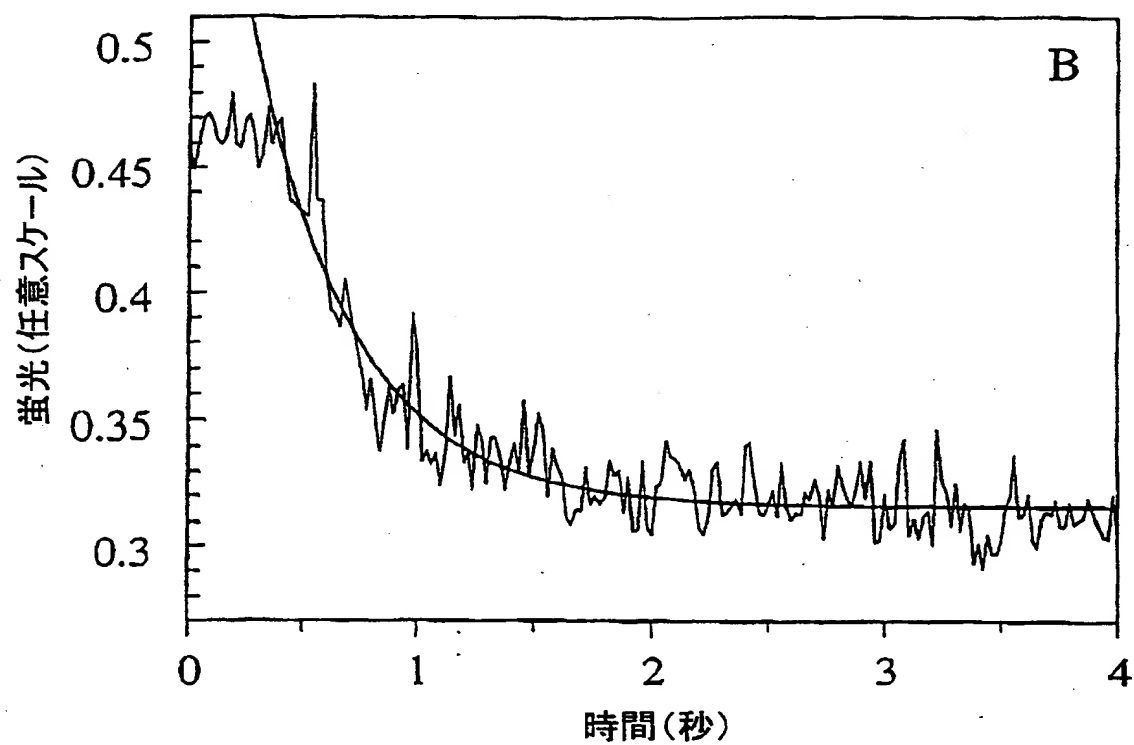
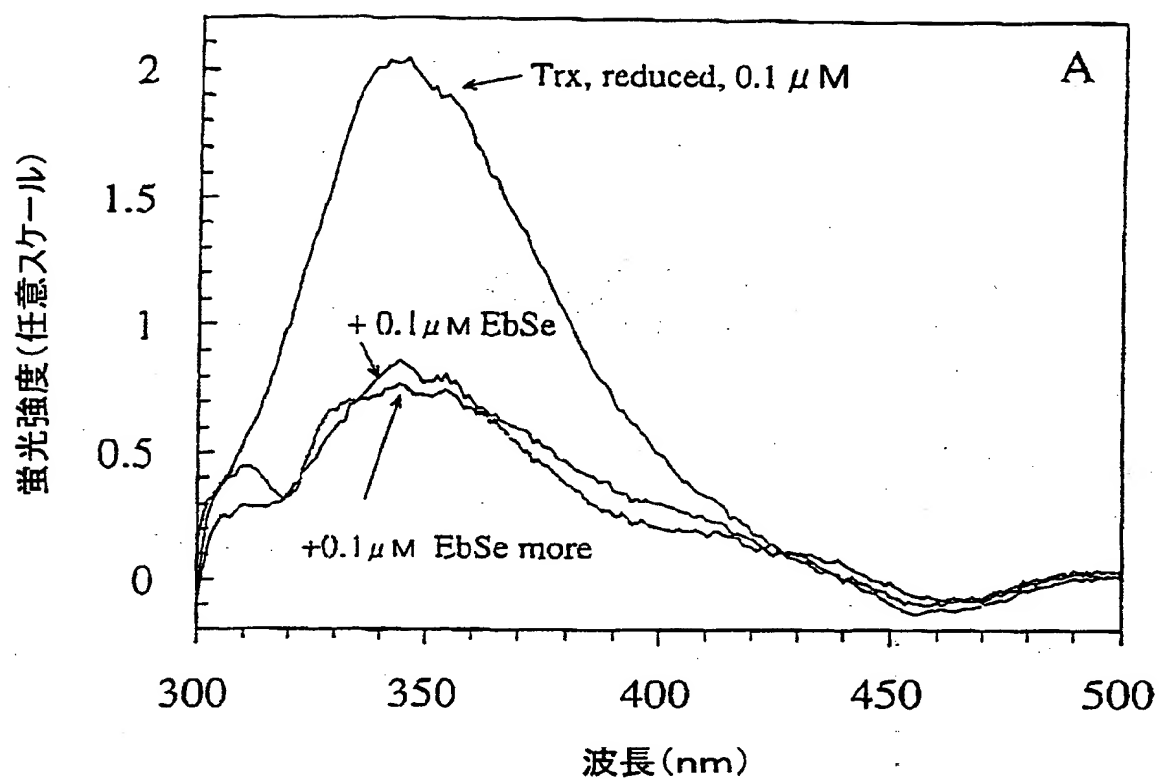
第2図



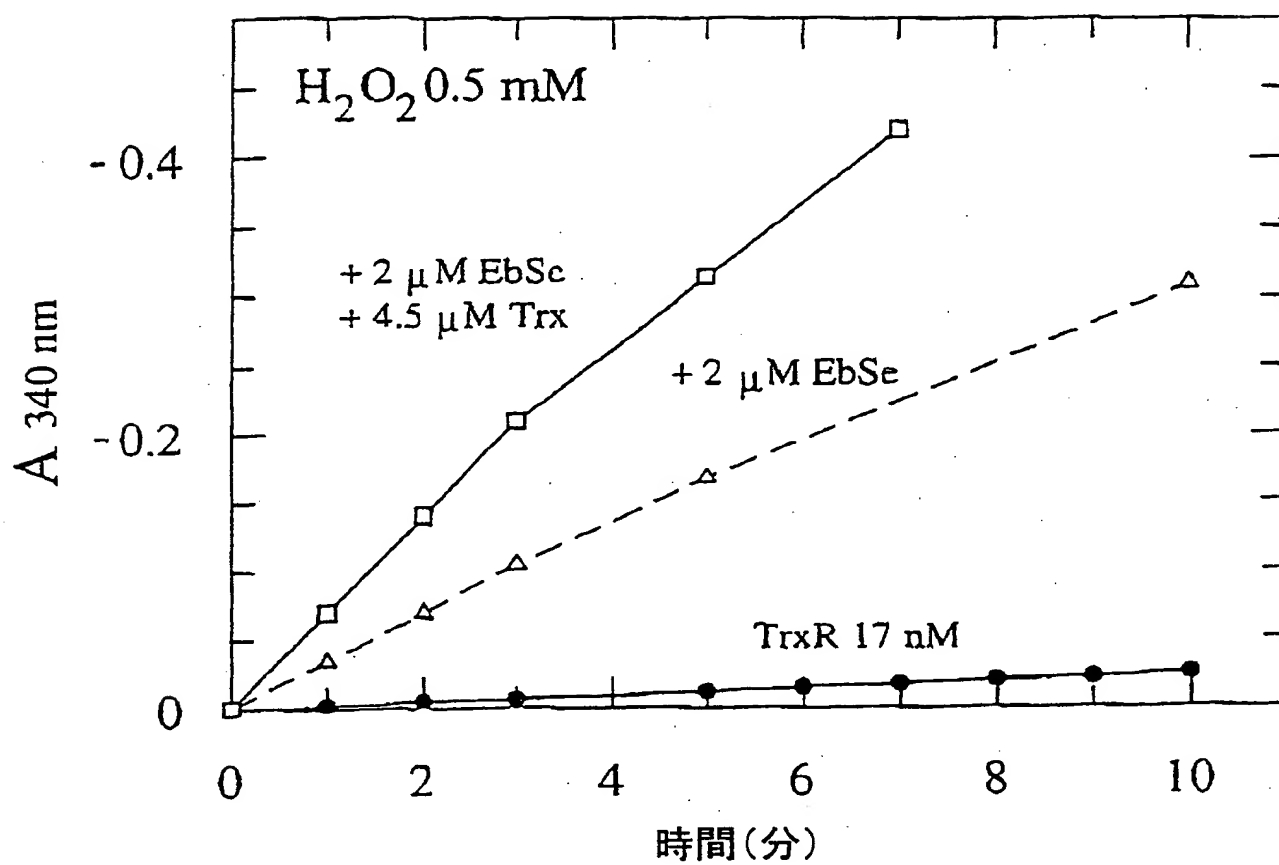
第3図



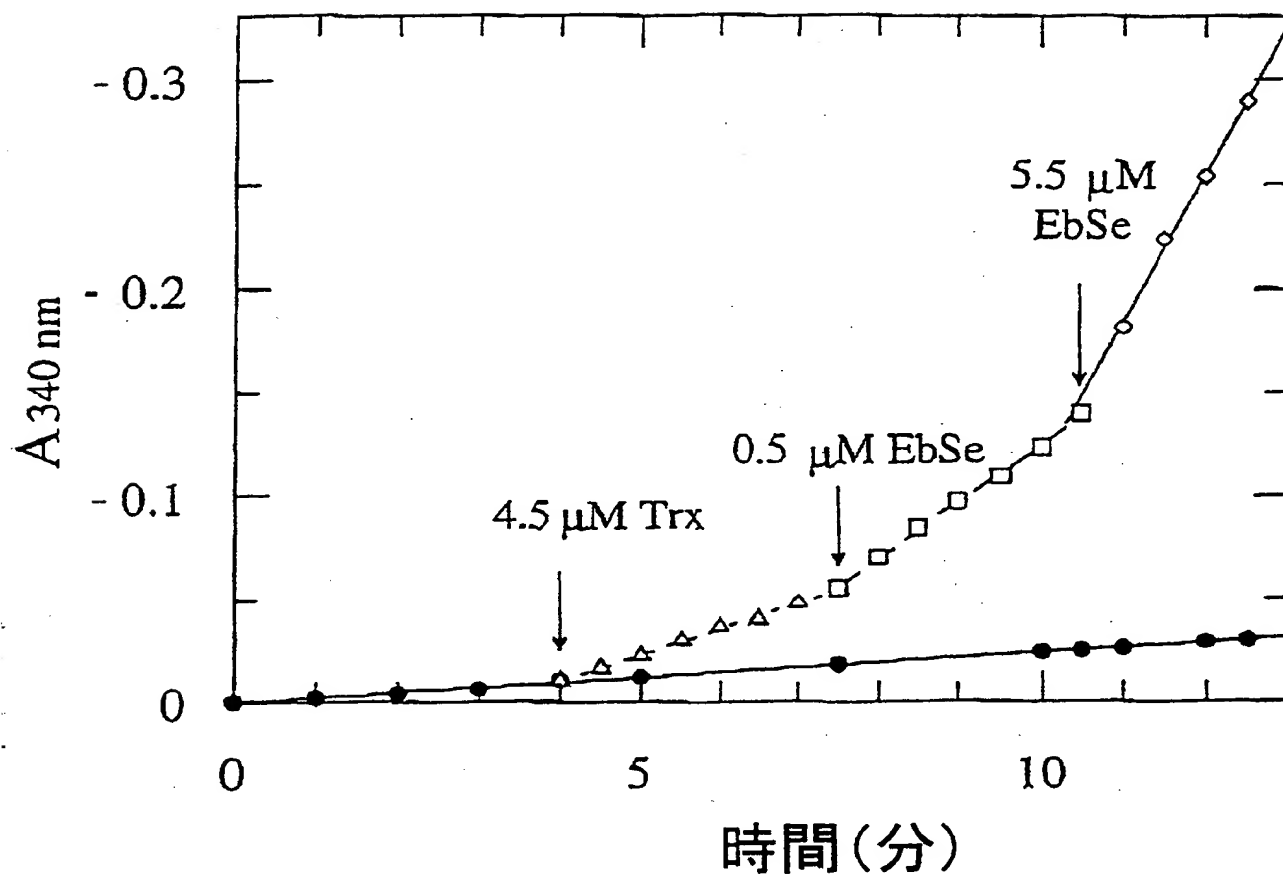
第4図



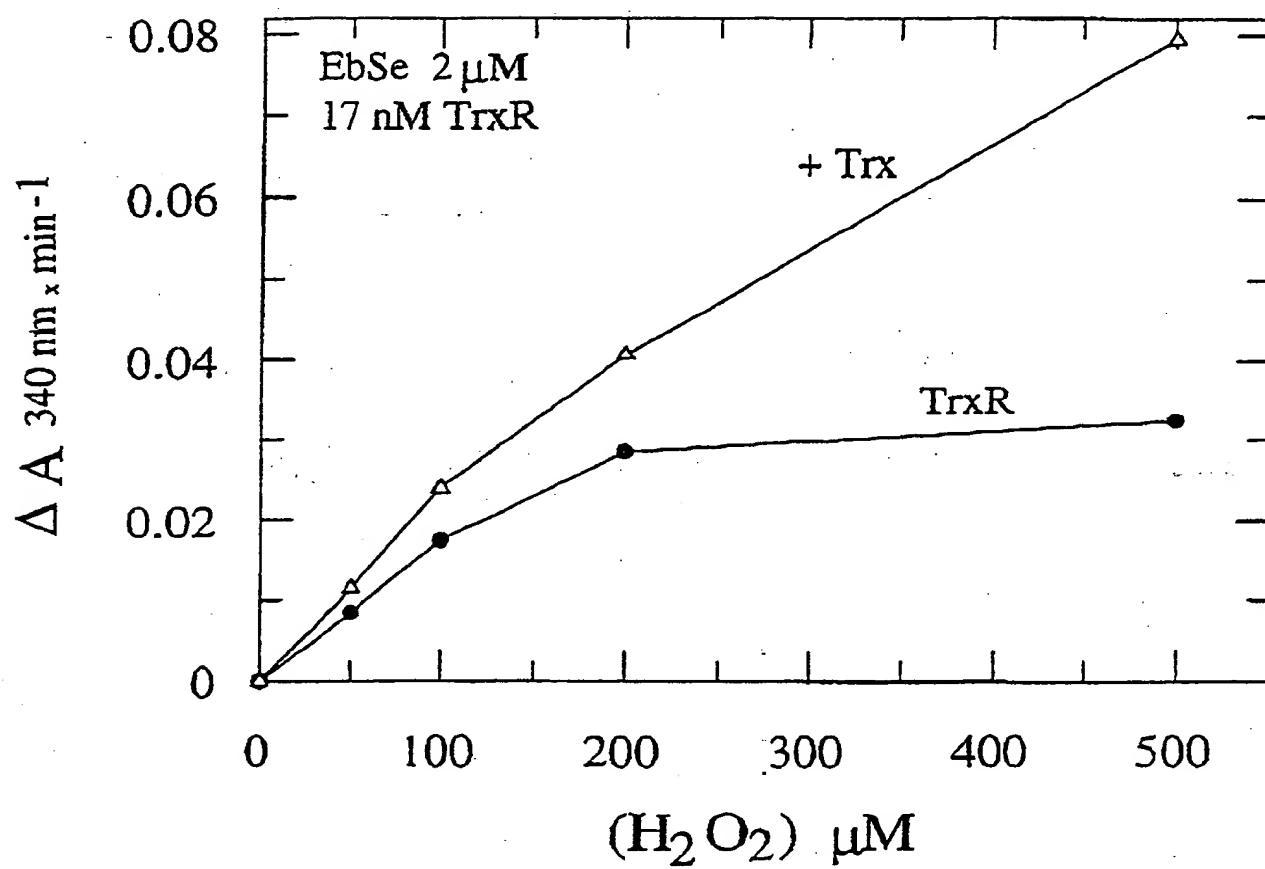
第5図



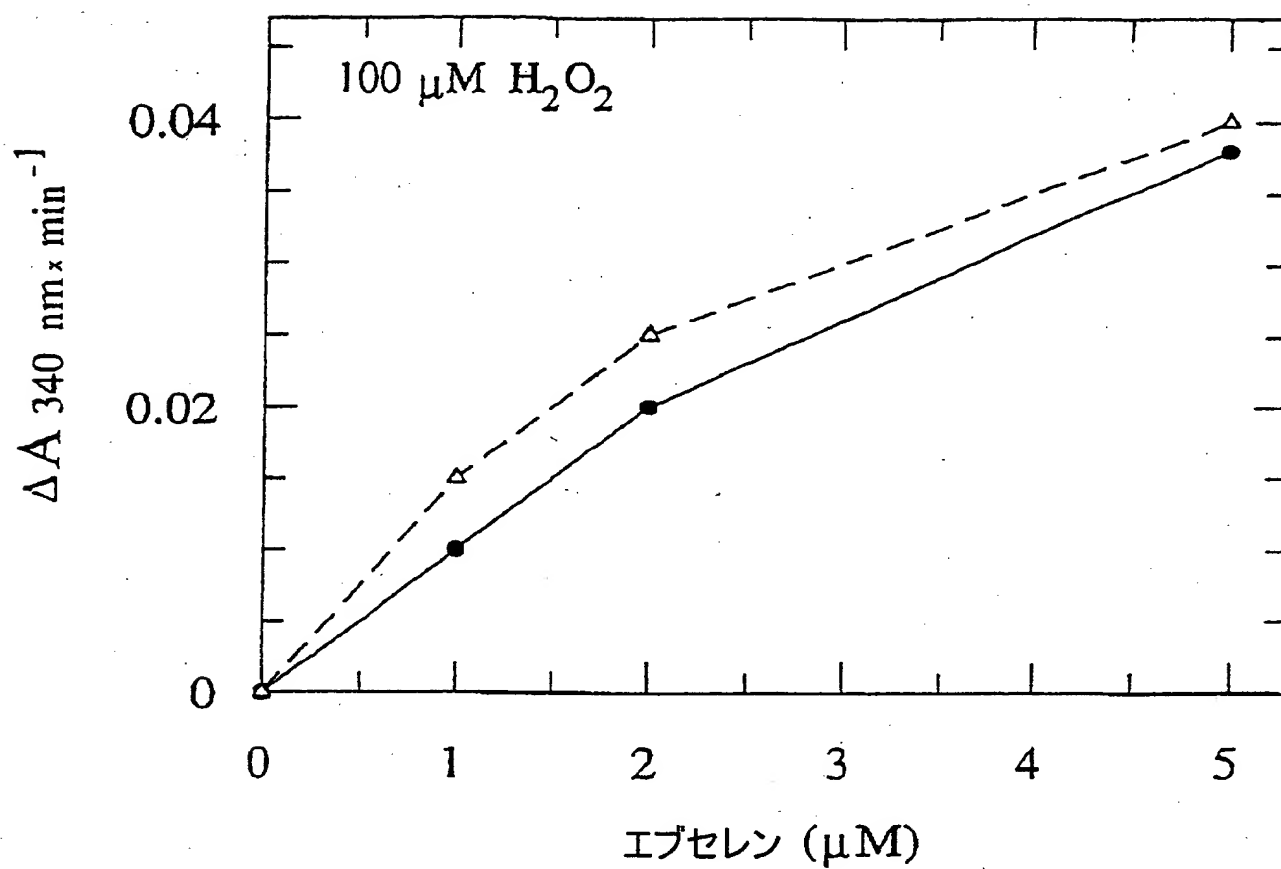
第6図



第 7 図



第8図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02076

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07C391/02, A61K31/166, A61P39/06, B01J31/12, C07B31/00, C09K15/32, C12N9/00, C12N9/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07C391/00, A61K31/00, A61P39/00, B01J31/00, C07B31/00, C09K15/00, C12N9/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY (STN), CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Gavin E ARTEEL et al. "Function of Thioredoxin Reductase as a Peroxynitrite Reductase Using Selenocystine or Ebselen", Chem. Res. Toxicol., 1999, Vol.12, No.3, pp.264-269	1-11
X	US, 4618669, A (A.Nattermann & Cie GmbH), 21 October, 1986 (21.10.86), Columns 1 to 6 & EP, 165534, A1 & JP, 61-50963, A	10,11
X	US, 4730053, A (A. Nattermann & Cie GmbH), 08 March, 1988 (08.03.88), Columns 1 to 6 & EP, 187233, A1 & JP, 61-137856, A	10,11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 July, 2000 (11.07.00)

Date of mailing of the international search report
25 July, 2000 (25.07.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/02076

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07C391/02, A61K31/166, A61P39/06, B01J31/12, C07B31/00, C09K15/32, C12N9/00, C12N9/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07C391/00, A61K31/00, A61P39/00, B01J31/00, C07B31/00, C09K15/00, C12N9/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Gavin E ARTEEL et al. "Function of Thioredoxin Reductase as a Peroxynitrite Reductase Using Selenocystine or Ebselen", Chem. Res. Toxicol., 1999, 第12巻, 第3号, p. 264-269	1-11
X	US, 4618669, A (A. Nattermann & Cie GmbH) 21. 10月. 1986 (21. 10. 86) 第1-6欄 & EP, 165534, A1 & JP, 61-50963, A	10, 11
X	US, 4730053, A (A. Nattermann & Cie GmbH) 8. 3月. 1988 (08. 03. 88) 第1-6欄 & EP, 187233, A1 & JP, 61-137856, A	10, 11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 07. 00

国際調査報告の発送日

25.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

前田 憲彦

印

4H

8318

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）



出願人代理人 今村正純 殿 あて名 〒 104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号 KRFビル5階
--

PCT見解書

(法第13条)
〔PCT規則66〕

出願人又は代理人 の書類記号 A01112M	発送日 (日.月.年) 25.07.00
国際出願番号 PCT/JPO0/02076	国際出願日 (日.月.年) 31.03.00
国際出願分類 (IPC) Int. Cl ⁷ C07C391/02, A61K31/166, A61P39/06, B01J31/12, C07B31/00, C09K15/32, C12N9/00, C12N9/04	優先日 (日.月.年) 31.03.99
出願人 (氏名又は名称) 第一製薬株式会社	

1. これは、この国際予備審査機関が作成した <u>1</u> 回目の見解書である。
2. この見解書は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 見解の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見
3. 出願人は、この見解書に回答することが求められる。 いつ? 上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合にに限られることに注意されたい。 どのように? 法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。 なお 補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。 応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。
4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により <u>31.07.01</u> である。

名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 前田 憲彦 電話番号 03-3581-1101 内線 3443	4H 8318
---	--	---------

I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条（PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	4 - 1 1	有
	請求の範囲	1 - 3	無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1 - 1 1	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1 - 1 1	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明

請求の範囲 1 - 3 について

国際調査報告で示した文献 1 (Gavin E ARTEEL et al. "Function of Thioredoxin Reductase as a Peroxynitrite Reductase Using Selenocystine or Ebselen", Chem. Res. Toxicol., 1999, 第12巻, 第3号, p. 264-269) により新規性を有しない。文献 1 には有機セレン化合物がチオレドキシンレダクターゼの基質として用いられることが記載されている。

請求の範囲 1 - 1 1 について

国際調査報告で示した文献 1 により進歩性を有しない。文献 1 には有機セレン化合物がチオレドキシンレダクターゼの活性を促進することが記載されているから、ペルオキシダーゼ活性の増強剤として用いることは当業者が容易になし得る。

請求の範囲 1 0 - 1 1 について

国際調査報告で示した文献 2 (US, 4618669, A (A. Nattermann & Cie GmbH) 21. 10 月. 1986 (21. 10. 86) 第1-6欄 & EP, 165534, A1 & JP, 61-50963, A)、及び文献 3 (US, 4730053, A (A. Nattermann & Cie GmbH) 8. 3 月. 1988 (08. 03. 88) 第1-6欄 & EP, 18723 3, A1 & JP, 61-137856, A) により進歩性を有しない。文献 2 及び 3 には有機セレン化合物が過酸化物の還元に作用することが記載されているから、当該化合物を生体内の還元又は過酸化防止に用いることは当業者が容易になし得る。

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第 40、41 条)
[P C T 1 8 条、P C T 規則 43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 A 0 1 1 1 2 M	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 2 0 7 6	国際出願日 (日.月.年) 3 1 . 0 3 . 0 0	優先日 (日.月.年) 3 1 . 0 3 . 9 9
出願人 (氏名又は名称) 第一製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第 41 条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第 47 条 (P C T 規則 38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07C391/02, A61K31/166, A61P39/06, B01J31/12, C07B31/00, C09K15/32, C12N9/00, C12N9/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07C391/00, A61K31/00, A61P39/00, B01J31/00, C07B31/00, C09K15/00, C12N9/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Gavin E ARTEEL et al. "Function of Thioredoxin Reductase as a Peroxynitrite Reductase Using Selenocystine or Ebselen", Chem. Res. Toxicol., 1999, 第12巻, 第3号, p. 264-269	1-11
X	US, 4618669, A (A. Nattermann & Cie GmbH) 21. 10月. 1986 (21. 10. 86) 第1-6欄 & EP, 165534, A1 & JP, 61-50963, A	10, 11
X	US, 4730053, A (A. Nattermann & Cie GmbH) 8. 3月. 1988 (08. 03. 88) 第1-6欄 & EP, 187233, A1 & JP, 61-137856, A	10, 11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 07. 00

国際調査報告の発送日

25.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

前田 憲彦

印

4 H

8318

電話番号 03-3581-1101 内線 3443



特許協力条約に基づく国際出願願書

A01112M

原本（出願用） - 印刷日時 2000年03月30日（30.03.2000）木曜日 13時53分23秒

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/R0/101 この特許協力条約に基づく国際 出願願書は、 右記によって作成された。	PCT 31.3.00 受領印
0-4-1		PCT-EASY Version 2.90 (updated 01.01.2000)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許 協力条約に従って処理されるこ とを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理 官庁	日本国特許庁 (R0/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	A01112M
I	発明の名称	チオレドキシシ・レダクターゼ基質
II	出願人	出願人である (applicant only)
II-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-2	右の指定国についての出願人で ある。	第一製薬株式会社 DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. 103-8234 日本国 東京都 中央区 日本橋3丁目14番10号 14-10, Nihonbashi 3-chome Chuo-ku, Tokyo 103-8234 Japan
II-4ja	名称	
II-4en	Name	
II-5ja	あて名:	
II-5en	Address:	
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-1	この欄に記載した者は	米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人で ある。	ホルムグレン アレン HOLMGREN, Arne S-17177 スウェーデン王国 ストックホルム カロリンスカインスティテュート メディカルノベル インスティテュートフォアバイオケミストリ内 Medical Nobel Institute for Biochemistry, Karolinska Institute S-17177 Stockholm Sweden
III-1-4ja	氏名(姓名)	
III-1-4en	Name (LAST, First)	
III-1-5ja	あて名:	
III-1-5en	Address:	
III-1-6	国籍 (国名)	スウェーデン王国 SE
III-1-7	住所 (国名)	スウェーデン王国 SE

特許協力条約に基づく国際出願願書

A01112M

原本(出願用) - 印刷日時 2000年03月30日 (30.03.2000) 木曜日 13時53分23秒

III-2	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-2-1	氏名(姓名)	アミリ マリアン エイチ
III-2-2	Name (LAST, First)	AMIRI, Marjan H.
III-2-4ja	あて名:	S-17177 スウェーデン王国
III-2-4en		ストックホルム
III-2-5ja		カロリンスカインスティテュート メディカルノベル インスティテュートフォアバイオケミストリ内
III-2-5en	Address:	c/o Medical Nobel Institute for Biochemistry, Karolinska Institute S-17177 Stockholm Sweden
III-2-6	国籍(国名)	スウェーデン王国 SE
III-2-7	住所(国名)	スウェーデン王国 SE
III-3	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-3-1	氏名(姓名)	政安 裕之
III-3-2	Name (LAST, First)	MASAYASU, Hiroyuki
III-3-4ja	あて名:	134-8630 日本国
III-3-4en		東京都 江戸川区
III-3-5ja		北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研 究開発センター内
III-3-5en	Address:	c/o DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD., Tokyo R & D Center, 16-13, Kita-kasai 1-chome Edogawa-ku, Tokyo 134-8630 Japan
III-3-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-3-7	住所(国名)	日本国 JP
IV-1	代理人又は共通の代表者、通知 のあて名 下記の者は国際機関において右 記のごとく出願人のために行動 する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名(姓名)	今村 正純
IV-1-1en	Name (LAST, First)	IMAMURA, Masazumi
IV-1-2ja	あて名:	104-0031 日本国
IV-1-2en	Address:	東京都 中央区 京橋1丁目5番5号 KRFビル5階 5th Floor, KRF Bldg., 5-5, Kyobashi 1-chome Chuo-ku, Tokyo 104-0031 Japan
IV-1-3	電話番号	03-3271-1331
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-3271-1410

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2000年03月30日（30.03.2000）木曜日 13時53分23秒

IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja	氏名	塩澤 寿夫; 釜田 淳爾
IV-2-1en	Name(s)	SHIOZAWA, Hisao; KAMATA, Junji
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AP: GH GM KE LS MW SD SL SZ TZ UG ZW 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国であ る他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国で ある他の国 EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国であ る他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締約国 である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW
V-3	国内特許(この版の EASY の配布後に特許協力条約の締 約国になった国)	DZ アルジェリア Democratic People's Republic of Algeria AG アンティグア・バーブーダ Antigua and Barbuda
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて 、規則4.9(b)の規定に基づき、 特許協力条約のもとで認められ る他の全ての国の指定を行う。 ただし、V-6欄に示した国の指 定を除く。出願人は、これらの 追加される指定が確認を条件と していること、並びに優先日から 15月が経過する前にその確認 がなされない指定は、この期間 の経過時に、出願人によって取 り下げられたものとみなされる ことを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主 張	
VI-1-1	先の出願日	1999年03月31日 (31.03.1999)
VI-1-2	先の出願番号	特願平11-92789
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	先の国内出願に基づく優先権主 張	
VI-2-1	先の出願日	1999年04月08日 (08.04.1999)
VI-2-2	先の出願番号	特願平11-101478
VI-2-3	国名	日本国 JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

A01112M

原本（出願用） - 印刷日時 2000年03月30日（30.03.2000）木曜日 13時53分23秒

VI-3	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の 番号のものについては、出願書 類の認証謄本を作成し国際事務 局へ送付することを、受理官庁 に対して請求している。	VI-1, VI-2
VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)
VIII	照合欄	用紙の枚数
VIII-1	願書	5
VIII-2	明細書	19
VIII-3	請求の範囲	3
VIII-4	要約	1
VIII-5	図面	8
VIII-7	合計	36
VIII-8	添付書類	添付
VIII-9	手数料計算用紙	✓
VIII-16	別個の記名押印された委任状	-
VIII-17	PCT-EASYディスク	-
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する 特許印紙を貼付した書 面
VIII-17	その他	国際事務局の口座への振 込みを証明する書面
VIII-18	要約書とともに提示する図の番 号	
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)
IX-1	提出者の記名押印	
IX-1-1	氏名(姓名)	今村 正純
IX-2	提出者の記名押印	
IX-2-1	氏名(姓名)	塩澤 寿夫
IX-3	提出者の記名押印	
IX-3-1	氏名(姓名)	釜田 淳爾

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類 の実際の受理の日	
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類 を補完する書類又は図面であつ てその後期間内に提出されたも のの実際の受理の日 (訂正日)	

特許協力条約に基づく国際出願願書

A01112M

原本（出願用） - 印刷日時 2000年03月30日（30.03.2000）木曜日 13時53分23秒

10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

PCT手数料計算用紙(願書付属書)

A01112M

原本(出願用) - 印刷日時 2000年03月30日 (30.03.2000) 木曜日 13時53分23秒

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0	受理官庁記入欄		
0-1	国際出願番号.		
0-2	受理官庁の日付印		
0-4	様式-PCT/RO/101 (付属書)		
0-4-1	このPCT手数料計算用紙は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.90 (updated 01.01.2000)	
0-9	出願人又は代理人の書類記号	A01112M	
2	出願人	第一製薬株式会社	
12	所定の手数料の計算	金額/係数	小計 (JPY)
12-1	送付手数料 T	⇒	18,000
12-2	調査手数料 S	⇒	77,000
12-3	国際手数料		
	基本手数料 (最初の30枚まで) b1	46,000	
12-4	30枚を越える用紙の枚数	6	
12-5	用紙1枚の手数料 (X)	1,100	
12-6	合計の手数料 b2	6,600	
12-7	b1 + b2 = B	52,600	
12-8	指定手数料 国際出願に含まれる指定国 数	84	
12-9	Number of designation fees payable (maximum 8)	8	
12-10	1指定当たりの手数料 (X)	9,900	
12-11	合計の指定手数料 D	79,200	
12-12	PCT-EASYによる料金の 減額 R	-14,200	
12-13	国際手数料の合計 (B+D-R) I	⇒	117,600
12-14	優先権証明書請求手数料 優先権証明書を請求した数	2	
12-15	1 優先権証明書当たり (X) の手数料	1,500	
12-16	優先権証明書請求手数料 の合計 P	⇒	3,000
12-17	納付すべき手数料の合計 (T+S+I+P)	⇒	215,600
12-19	支払方法	送付手数料: 特許印紙 調査手数料: 特許印紙 国際手数料: 銀行口座への振込み 優先権証明書請求手数料: 特許印紙	

EASYによるチェック結果と出願人による言及

13-1-1	出願人による言及 氏名(名称)	9 6 2 1 弁理士 今村正純
--------	--------------------	------------------

13-1-2	出願人による言及 氏名(名称)	9 2 6 3 弁理士 塩澤寿夫
13-1-3	出願人による言及 氏名(名称)	9 5 8 4 弁理士 釜田淳爾
13-2-2	EASYによるチェック結果 指定国	Green? より多くの指定が可能です。(以下の国が指定からは ずされています: KP) 確認してください。
		Yellow! "追加する指定国"の欄を用いた指定がなされています が、この欄を用いることなく、更新された最新のメイ ンテナンステーブルを入手し使用することを推奨しま す。
13-2-3	EASYによるチェック結果 氏名(名称)	Green? 出願人 1: 電話番号が記入されていません。
		Green? 出願人 1: ファクシミリ番号が記入されていません。
13-2-6	EASYによるチェック結果 内訳	Green? 要約書とともに提示する図の番号が示されていません 。
		Yellow 添付書類"別個の記名押印された委任状"が含まれてい ません。
13-2-9	EASYによるチェック結果 注釈	Yellow! 願書に表示しなければならない通常の項目はすべて他 のPCT-EASYの機能で入力することができます。言及を 用いた表示の有効性について確認してください。
13-2-10	EASYによるチェック結果 受理官庁/国際事務局記入欄	Green? この願書を作成したPCT-EASYは英語版ないし西欧言語 版以外のWindows上で動作しています。ASCII文字以外 の文字について、願書と電子データを注意して比較し てください。

明 細 書

チオレドキシン・レダクターゼ基質

技術分野

本発明は、チオレドキシン・レダクターゼの基質、及びチオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性の増強剤に関する。

背景技術

チオール基の酸化還元機構の一つとしてチオレドキシン（以下、本明細書において「TRX」と略す場合がある）－チオレドキシン・レダクターゼ系の存在が知られている。この系はチオール基の可逆的な酸化還元を調節し、生体内のチオールレベルを一定に保つことにより、ジスルフィド結合の形成や過酸化状態の亢進によるチオール蛋白質の機能低下を防止している。

チオレドキシン・レダクターゼは NADPH とチオレドキシンの存在下で標的蛋白質のジスルフィド結合を還元開裂させる活性を有しており、その他にも非常に多岐にわたる生理作用を担っていることが解明されている。チオレドキシン・レダクターゼの基質となるチオレドキシンは、セレノシステインを含有し、2分子のチオール基を分子内に持つ蛋白であり、リボヌクレオチドレダクターゼがリボヌクレオチドを還元する際のプロトン供与体としても作用している。

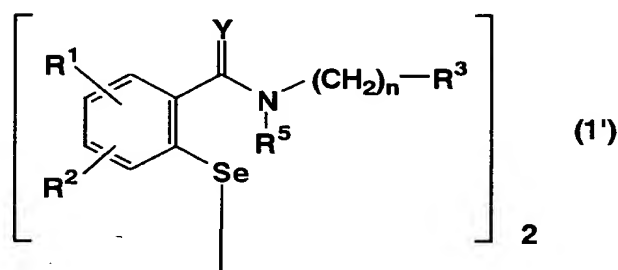
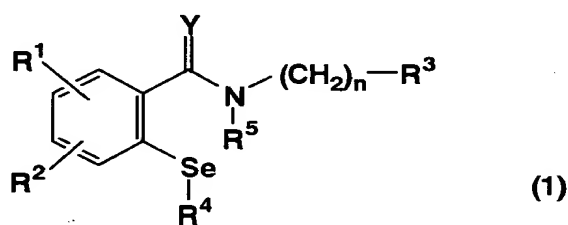
発明の開示

本発明の課題は、チオレドキシン・レダクターゼの基質として作用し、チオレドキシン－チオレドキシン・レダクターゼ系を活性化できる物質を提供することにある。特に、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性を増強することができる物質を提供することが本発明の課題である。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、2-フェニル-1,2-

ベンゾイソセレナゾール-3(2H)-オンなどのセレン化合物がチオレドキシン・レダクターゼの基質となり、それ自身が酸化－還元を繰り返してチオレドキシン－チオレドキシン・レダクターゼ系におけるチオレドキシンと同様に作用できること、並びにこの物質が、チオレドキシン・レダクターゼ及びチオレドキシンの共存下においてチオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性を顕著に増強できることを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。なお、上記物質についてはグルタチオンペルキシダーゼ様作用により過酸化物(活性酸素)を還元しうることは知られているが (Muller, A. et al., Biochem. Pharmacol., 33, pp.3235-3239)、グルタチオンペルオキシダーゼによる過酸化物の還元作用とチオレドキシン・レダクターゼを介した過酸化物の還元作用とは全く別異の機序に基づくものである。

すなわち、本発明は、以下の一般式 (I) 又は (I') :



(式中、 R^1 及び R^2 は、それぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、ニトロ基、炭素数 1~6 のアルキル基、又は炭素数 1~6 のアルコキシル基を示し、 R^1 及び R^2 が一緒になってメチレンジオキシ基を形成してもよく； R^3 はアリール基、芳香族複素環基、5~7 員のシクロアルキル基、又は 5~7 員のシク

ロアルケニル基を示し、該アリール基、該芳香族複素環基、該シクロアルキル基、及び該シクロアルケニル基は1個又は2個以上の置換基を有していてもよく； R^4 は水素原子、水酸基、 $-S-$ グルタチオン基、 $-S-\alpha-$ アミノ酸基、又はアリール部分に1個又は2個以上の置換基を有していてもよいアルキル基を示し； R^5 は水素原子又は炭素数1~6のアルキル基を示し、 R^4 及び R^5 は一緒になって単結合を形成してもよく；Yは酸素原子又は硫黄原子を示し；nは0~5の整数を示し；セレン原子は酸化されていてもよい）

で表わされる化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含むチオレドキシン・レダクターゼ基質を提供するものである。

上記発明の好ましい態様によれば、2-フェニル-1,2-ベンゾイソセレナゾール-3(2H)-オン又はその開環体及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む上記のチオレドキシン・レダクターゼ基質；及び、NADPHの存在下でチオレドキシン・レダクターゼにより還元される上記のチオレドキシン・レダクターゼ基質が提供される。

別の観点からは、上記の一般式(I)又は(I')化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性の増強剤が提供され、その好ましい態様として、2-フェニル-1,2-ベンゾイソセレナゾール-3(2H)-オン又はその開環体及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む上記の活性増強剤が提供される。

さらに別の観点からは、上記の一般式(I)又は(I')化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシンを酸化する触媒；上記の物質を含む、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシンを酸化

することにより過酸化物を還元する作用を有する還元剤；及び、上記の物質を含む、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシンを酸化することにより生体内物質の過酸化を防止する抗酸化剤が提供される。

また、上記基質、上記チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性の増強剤、上記触媒、上記還元剤、及び上記抗酸化剤としての上記の一般式（I）又は（I'）化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質の使用、及び上記基質、上記チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性の増強剤、上記触媒、上記還元剤、及び上記抗酸化剤の製造のための上記の一般式（I）又は（I'）化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質の使用が本発明により提供される。

これらの発明に加えて、生体内においてチオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性を増強する方法であって、上記の一般式（I）又は（I'）化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法；生体内において過酸化物を還元する方法であって、上記物質の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法；及び生体内において生体内物質の過酸化を防止する方法であって、上記物質の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法が提供される。

図面の簡単な説明

第1図は、ヒトチオレドキシン・レダクターゼによる化合物A(2-フェニル-1,2-ベンズイソセレンゾール-3(2H)-オン、「エブセレン」)の還元作用を示す。

第2図は、チオレドキシン・レダクターゼによる化合物Aの還元作用を示す。(A)は低濃度チオレドキシン・レダクターゼによる化合物Aの還元を示し、(B)は化合物Aをチオレドキシン・レダクターゼにより10分間還元した後の、DTNBに

よるセレノール基生成の検出結果を示す。図中、Ebselen は化合物 A を意味する。

第 3 図は、チオレドキシン・レダクターゼによる化合物 A の還元作用に対するヒトチオレドキシンの影響を示す。

第 4 図は、蛍光分光光度法による大腸菌 Trx-(SH)₂ の化合物 A による酸化 (図 A) 及び 0.1 μM Trx-(SH)₂ と 0.1 μM の化合物 A を混合した後の 340 nm における蛍光発光の減衰率を示す。図中、Trx はチオレドキシン、EbSe は化合物 A を示す。

第 5 図は、トチオレドキシン・レダクターゼによる過酸化水素の還元と化合物 A 及びチオレドキシンの作用を示す。図中、Trx はチオレドキシン、EbSe は化合物 A、TrxR はチオレドキシン・レダクターゼを示す。

第 6 図は、チオレドキシン・レダクターゼによる過酸化水素の還元反応に及ぼすチオレドキシンと化合物 A の作用を示す。図中、Trx はチオレドキシン、EbSe は化合物 A を示す。

第 7 図は、チオレドキシン・レダクターゼの化合物 A への作用に及ぼす過酸化水素の濃度の影響を示す。図中、Trx はチオレドキシン、TrxR はチオレドキシン・レダクターゼ、EbSe は化合物 A を示す。

第 8 図は、過酸化水素の還元反応に対する化合物 A の作用を示した図である。図中、Ebselen は化合物 A を意味する。

発明を実施するための最良の形態

R¹ 及び R² が示す炭素数 1~6 個のアルキル基としては、直鎖又は分枝鎖のいずれでもよい。例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基などを挙げることができる。R¹ 及び R² が示す炭素数 1~6 個のアルコキシ基としては、直鎖又は分枝鎖のいずれでもよく、例えば、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、n-ブトキシ基、sec-ブトキシ基、tert-ブトキシ基、n-ペントキシ基、n-ヘキソキシ基などを挙げることができる。

R^3 が示すアリール基としては、例えば、炭素数 6~14 個、好ましくは炭素数 6~10 個の単環性ないし 3 環性、好ましくは単環性又は 2 環性のアリール基を用いることができる。具体的には、フェニル基又はナフチル基などが好適である。 R^3 が示す芳香族複素環基としては、窒素原子、酸素原子、イオウ原子などのヘテロ原子を 1 個又は 2 個以上含む、例えば、単環性ないし 3 環性、好ましくは単環性又は 2 環性の芳香族複素環基を用いることができる。2 個以上のヘテロ原子を含む場合には、それらは同一でも異なってもよい。例えば、チエニル基、フリル基、ピロリル基、イミダゾリル基、ピラゾリル基、イソオキサゾリル基、ピリジル基、ピラジニル基、ピリミジニル基、ピリダジニル基、インドリジニル基、イソインドリル基、インドリル基、イソキノリル基、キノリル基、フタラジニル基、ナフチリジニル基、キノキサリニル基、キナゾリニル基、シンノリニル基、プテリジニル基、カルバゾリル基、アクリジニル基、フェナンスリジニル基、フェノチアジニル基などを挙げることができる。

R^3 が示すアリール基、芳香族複素環基、5~7 員環のシクロアルキル基、又は 5~7 員環のシクロアルケニル基は、その環上に 1 個又は 2 個以上の置換基を有していてもよい。2 個以上の置換基を有する場合には、それらは同一でも異なってもよい。置換基の存在位置は特に限定されず、環上の任意の位置に存在することができる。置換基の種類も特に限定されないが、例えば、 C_1 - C_6 アルキル基、 C_2 - C_6 アルケニル基、 C_2 - C_6 アルキニル基、 C_6 - C_{14} アリール基、複素環基（本明細書において複素環という場合には、芳香族複素環のほか、部分飽和又は飽和の複素環を包含する）、ハロゲン原子（本明細書においてハロゲン原子という場合には、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよい）、ヒドロキシ基、オキシ基、アミノ基、アンモニウム基、イミノ基、メルカプト基、チオキシ基、シアノ基、ニトロ基、カルボキシル基、リン酸基、スルホ基、ヒドラジノ基、 C_1 - C_6 ウレイド基、 C_1 - C_6 イミド基、イソチオシアナート基、イソシアナート基、 C_1 - C_6 アルコキシ基、 C_1 - C_6 アルキルチオ基、 C_6 - C_{14} アリールオキシ基、複素環オキシ基、 C_6 - C_{14} アリールチオ基、複素環チオ基、 C_7 - C_{15} アラルキル基、複素環アルキ

ル基、 C_7-C_{15} アラルキルオキシ基、複素環アルキルオキシ基、 C_1-C_6 アルコキシカルボニル基、 C_6-C_{14} アリールオキシカルボニル基、複素環オキシカルボニル基、 C_2-C_7 アルキルカルボニル基、 C_6-C_{14} アリールカルボニル基、複素環カルボニル基、 C_2-C_7 アルキルカルボニルオキシ基、 C_6-C_{14} アリールカルボニルオキシ基、複素環カルボニルオキシ基、 C_2-C_8 アルキルカルボニルアミノ基、 C_1-C_6 スルホニル基、 C_1-C_6 スルフィニル基、 C_1-C_6 スルホニルアミノ基、 C_1-C_6 カルバモイル基、又は C_2-C_6 スルファモイル基などを挙げることができる。

さらに、上記に例示した置換基は、さらに 1 又は 2 個以上の他の置換基で置換されていてもよい。このような例として、例えば、ヒドロキシ C_1-C_6 アルキル基、ハロゲン化 C_1-C_6 アルキル基、モノ若しくはジ C_1-C_6 アルキルアミノ基、ハロゲン化 C_1-C_6 アルキルカルボニル基、ハロゲン化 C_6-C_{14} アリール基、ヒドロキシ C_6-C_{14} アリール基、モノ又はジ C_1-C_6 アルキルカルバモイル基などを挙げることができる。もっとも、上記に説明した置換基は例示のためのものであり、これらに限定されることはない。

R^4 が示す $-S-\alpha$ -アミノ酸基の種類は特に限定されないが、チオール基含有のアミノ酸の残基であることが好ましく、 $-S-\alpha$ -アミノ酸基は蛋白質又はペプチド化合物を構成するアミノ酸の残基であってもよい。蛋白質又はペプチド化合物としては、生理的に許容されるものであればその種類は限定されないが、例えば、アルブミン、グロブリン等の血清中の蛋白質を用いることが好ましい。血清中の蛋白質のうちアルブミンがより好ましく、ヒトアルブミンが特に好ましい。 R^4 が示すアリール部分に 1 個又は 2 個以上の置換基を有していてもよいアラルキル基としては、ベンジル基、パラヒドロキシベンジル基、2,4-ジヒドロベンジル基などを挙げることができる。 R^4 及び R^5 は一緒になって単結合を形成してもよく、その場合には、 R^5 が結合する窒素原子とセレン原子とを含む 5 員環が形成される。 R^5 が示す炭素数 1~6 のアルキル基としては、上記に例示したものをを用いることができる。

本発明のチオレドキシシ・レダクターゼ基質としては、上記式 (1) 又は式 (1')

で表される化合物の生理学的に許容される塩を用いてもよい。生理学的に許容される塩は当業者に適宜選択可能である。また、遊離形態の化合物又は生理学的に許容される塩の水和物を用いることもできる。なお、上記式(1)又は(1')で表される化合物は1個又は2個以上の不斉炭素を有する場合があるが、光学異性体、ジアステレオ異性体などの立体異性体、立体異性体の任意の混合物、ラセミ体などを本発明の基質として用いてもよい。

本発明の基質として、例えば、2-フェニル-1,2-ベンズイソセレナゾール-3(2H)-オン(一般名では「エブセレン(ebselen)」と呼ばれる。)又はS-(2-フェニルカルバモイル-フェニルセレニル)-アルブミンなどを挙げることができ、これらの化合物の生理学的に許容される塩又は水和物も本発明の基質として好ましい。2-フェニル-1,2-ベンズイソセレナゾール-3(2H)-オンの製造方法は、特公平 2-38591号公報に開示されており、S-(2-フェニルカルバモイル-フェニルセレニル)-アルブミンの製造方法は特開平 7-233056号公報に開示されている。従って、これらの製造方法を参照することにより、当業者は上記式(1)又は式(1')に包含される任意の化合物を容易に製造することが可能である。

上記式(1)又は式(1')で表わされる本発明の基質は、チオレドキシシ・レダクターゼにより還元され、チオレドキシシ・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性を増強することができる。また、本発明の基質は、チオレドキシシ・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシシを酸化する触媒として作用することができ、チオレドキシシ・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシシを酸化することにより過酸化物を還元する還元剤としても作用することができる。さらに、チオレドキシシ・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシシを酸化することにより生体内物質の過酸化を防止する抗酸化剤としても作用できる。

従って、本発明の基質を医薬としてヒトを含む哺乳類動物に投与することにより、生体内のチオレドキシシ・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応を増強することができ、その結果、生体内物質の過酸化を防止し、あるいは生体内の過酸化

物を還元することができ、生体内のチオール蛋白やチオール化合物の酸化－還元状態の恒常性を保つことができる。本発明の基質を有効成分として含む医薬は、例えば、細胞内酸化還元調節の異常に起因し、細胞内酸化還元調節の異常を伴う疾患の予防及び／又は治療に有用である (Mattson, M.P. et al., Nature, 382, pp.674-675, 1996)。このような疾患として、例えば、虚血性臓器疾患 (脳、心臓、肝臓、腎臓、消化器等)、不適切なアポトーシス誘発による神経退行性疾患 (アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病、家族性筋萎縮性側索硬化症[ALS]、エイズ等) や放射線障害、悪性腫瘍 (白血病など)、及び各種炎症性疾患やエンドキシンショック等を挙げることができる。

いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、酸化ストレスと虚血性臓器疾患や各種炎症及びエンドトキシンショックとの関連性が認められており、これら虚血性臓器疾患に不適切なアポトーシス誘発の関与が近年確認されている (Hockonbery, D.M. et al., Cell, 75, pp.241-251, 1993)。アポトーシス惹起の過程においては、種々の要因による細胞内過酸化物質 (活性酸素)、特に過酸化水素の生成により細胞内核蛋白転写因子 NF- κ B の活性化、すなわち抑制蛋白質 I κ B の NF κ B よりの離脱がもたらされ、プログラムされた細胞死 (アポトーシス) が引き起こされることが知られている (Frank, J.T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 87, pp.9943-9947, 1990)。

これら NF- κ B は、チオレドキシンによるレドックス制御も受けている (Hayashi, T. et al., Biol. Chem., 268, pp.11380-11388, 1993)。通常、NF- κ B の SH 基は I κ B と結合した不活性型状態では S-S 結合を形成しており、I κ B が障害となってチオレドキシンは近づけない。このため、刺激により活性化されて I κ B が遊離しても、酸化型 NF- κ B は DNA に結合することができないが、チオレドキシンが NF- κ B の S-S 結合を還元して活性化型 NF- κ B となると、これが核内に移行して DNA に結合し、遺伝子を活性化してアポトーシスや各種炎症反応が惹起される。従って、本発明の基質は、Trx による還元反応の抑制に関与すると考えられる。

本発明の基質を医薬として用いる場合には、上記式 (1) 又は式 (1') で表さ

れる化合物及び生理学的に許容されるその塩、並びにそれらの水和物からなる群から選ばれる物質をそのまま投与してもよいが、一般的には、有効成分である上記物質と製剤用添加物とを含む医薬組成物を製造して投与することが望ましい。製剤用添加物としては、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、溶解剤等を用いることができ、2種以上の製剤用添加物を組み合わせて用いることもできる。医薬組成物の形態は特に限定されないが、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤などの経口投与用組成物、注射剤、点滴剤、坐剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤、クリーム剤、軟膏剤、点鼻剤、点眼剤、点耳剤、貼付剤などの非経口投与用組成物を挙げることができる。これらの医薬組成物は当業界で汎用の方法により製造することが可能である。

上記医薬の投与量は、適用すべき疾患の種類、患者の年齢や体重、疾患の重症度などの条件に応じて、適宜選択することが可能である。例えば、経口投与の場合、成人一日あたり 0.05～5,000mg（有効成分量として）の範囲である。2-フェニル-1,2-ベンズイソセレンゾール-3(2H)-オンを有効成分として含む医薬を用いる場合には、その投与量は、経口投与の場合、成人一日あたり 100～2,000mg（有効成分量として）であり、好ましくは、200～1,000mg の範囲である。もともと、上記の投与量は上記の条件に応じて適宜増減することができる。

実施例

以下、本発明を実施例により説明するが、本発明は下記の実施例に限定されることはない。以下の実施例中、化合物Aは 2-フェニル-1,2-ベンズイソセレンゾール-3(2H)-オン（図中、Ebselen と記する場合がある）を示す。

例 1：製剤例

（錠剤）

化合物A	50 mg
カルボキシメチルセルロース	25 mg

でんぷん	5 mg
結晶セルロース	40 mg
ステアリン酸マグネシウム	2 mg
計	122 mg

例 2 : 試験例

(A)材料と方法

(1)材料および酵素

NADPH と DTNB はシグマ社、過酸化水素(30%)とジメチルスルホキシドはメルク社の製品を用いた。子牛胸腺由来又はヒト胎盤由来のチオレドキシン・レダクターゼ (TrxR) はラットの肝酵素用に報告されているものに準じて精製し、均質化したものを用いた(活性度:酵素 1 mg あたり毎分 $25 \mu\text{mol}$ の NADPH を酸化する)。大腸菌由来のチオレドキシン(Trx)は均質化処理したものを用い、ヒトリコンビナントチオレドキシンおよび突然変異菌 C62S/C72S はレンらの方法で調製した。化合物 A は実験前にジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。

(2)分光光度法による測定

化合物 A の存在下での酵素活性は、セミマイクロ石英キュベットにサンプルを加え、自動サンプルエクステンジャーとレコーダー付き PMQ3 分光光度計 (ツアイス社) で室温で測定した。

(3)酵素アッセイ

チオレドキシン・レダクターゼ活性の測定は、TE 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) に $100 \mu\text{M}$ の NADPH と所定量の化合物 A を加えて行なった。チオレドキシン・レダクターゼのストック溶液 $5 \sim 10 \mu\text{l}$ を上記混合物に加え、最終液量 0.55 ml として反応を行った。比較用試料のキュベットには測定試料と同量の DMSO とチオレドキシン・レダクターゼを加え、比較用キュベットの吸光度を自動的に吸光度計で差し引いた。反応の進行は 340 nm で追跡した。

チオレドキシン・レダクターゼの活性はインスリン定量法で行なった。100 mM

リン酸カリウム(pH 7.0)、2 mM NADPH、及び0.16 mM インスリンを混合し、化合物A及びチオレドキシンを加え、最後にチオレドキシン・レダクターゼを加えて総液量 0.55 ml として反応を行なった。インスリンジスルフィドの還元反応の進行は 340 nm で追跡した。生成した硫化水素基又はセレノール基は、6 M グアニジン-HCl、0.20 M Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM DTNB の混合液 0.50 ml を加えて 412 nm で測定し、 $13,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ のモル吸光係数を用いて算出した。NADPH を用いたチオレドキシン・レダクターゼの DTNB 還元活性は、10 mM EDTA、0.2 mM NADPH、5 mM DTNB、及び0.1 mg/ml のウシ血清アルブミンを含む 100 mM リン酸カリウム(pH 7.0) 溶液中で 412 nm で測定した。

(4)NADPH の酸化で生成したセレノール基の算出

化合物Aは 340 nm でモル吸光係数 $4,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ の吸光度を示す。またジチオールによるセレノール還元化合物である N-フェニル-2-カルボキシアミドベンゼンセレノールは 340 nm で半分の吸光度 ($2,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を示す。過剰の DTT の存在下又は非存在下において化合物A-セレノールが生成することを吸光度曲線から確認した。化合物A-セレノールの生成量算定では、NADPH の酸化により生ずる NADP^+ が $6,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ のモル吸光係数を有するので、 $8,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ のモル吸光係数を用いた。

(5)蛍光測定

蛋白の蛍光測定は自動温度調節 SPEX-Fluoro Max 計で行なった。Trx-(SH)₂ は大腸菌由来の Trx-S₂ 640 μM を室温で 10 mM DTT と共に 20 分間インキュベートし調製し、その後、DTT をゲルクロマトグラフィーで除いた (N₂ 平衡緩衝液を NAP-5 カラム (ファルマシア製) に通した)。Trx-(SH)₂ は 0.1 M 燐酸カリウムと 1 mM EDTA の 3 ml 混合液(pH 7.5)中に溶解した化合物Aと混合し、直ちに 22°C で蛍光分光光度計により測定した。波長 290 nm で蛍光励起した後、波長 300 から 500 nm の範囲で発光スペクトルを記録した。340 nm での蛍光を用いて Trx-(SH)₂ の酸化反応速度を追跡して反応速度を記録した。

(B)結果

(1) ヒトチオレドキシン・レダクターゼによる化合物Aの還元

化合物A 50 μ M 又は 100 μ M と NADPH (100 μ M) とを加えたキュベットに純粋なヒトレドキシンレダクターゼ (40 nM 又は 4.5 μ g/ml) を加えると、340 nm の吸光度が急激に減少し、化合物Aがヒトチオレドキシン・レダクターゼの基質となることが確認された。図1に結果を示す。50 μ M (●) 又は 100 μ M (□) の化合物Aを 50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA (pH 7.5)、100 μ M NADPH を含む溶液 0.55 ml に加え、40 nM ヒトチオレドキシン・レダクターゼと混合した。340 nm での吸光度を測定し、ブランク (化合物Aのみを除外し他の酵素を同量含む) 値で補正した。同様の実験を 17 nM の酵素に化合物A 50 μ M (●) 及び 100 μ M (△) を混合して行った。

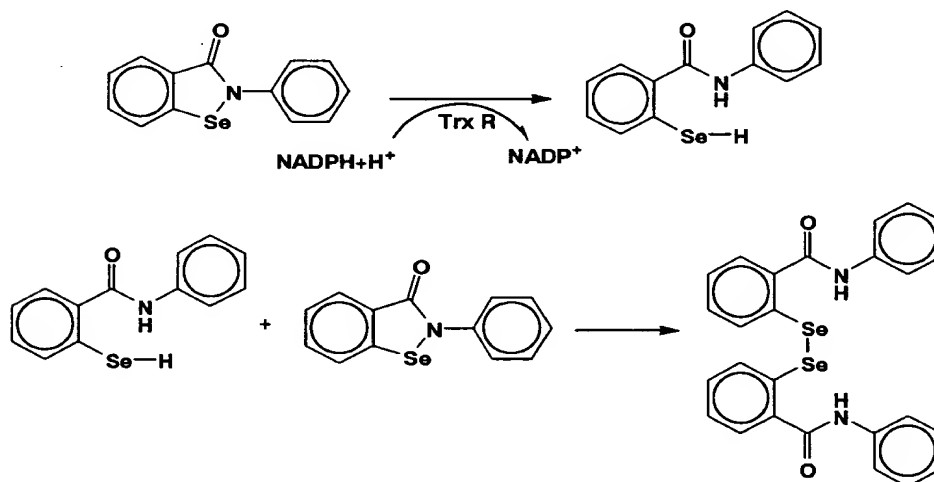
化合物A 50 μ M では反応が1分で完了し、この反応が速いことが認められた。その後、非常にゆっくり 340 nm での吸光度が減少したが、これは化合物Aがセレナイト、セレノシステイン等の他のセレン化合物と異なり酸素と酸化還元サイクルをしないことを示している。DTNB を含む 6 M グアニジン HCl を 7 分後にキュベットに加えたところ、412 nm における吸光度が 0.400 となり、セレノール基の生成が確認された。化合物A自身は DTNB と反応しなかった。化合物A 100 μ M を添加した時の反応速度は酵素を 40 nM 用いた場合の 340 nm 吸光度から見て遅いように思われた。

より低い濃度の酵素で実験によると、酵素 17 nM、化合物A 100 μ M の場合に見られるように 340 nm での吸光度は複雑な変化を示した (図1)。340 nm の吸光度は初期に減少した後増加し、その後減少して 15 分後には酵素 40 nM 添加の場合と同じ値を示した。酵素 7.5 nM を添加し、化合物Aの量を 10、20、50、100 μ M に変化させた場合の結果を図2に示す。図2 Aには低濃度でのチオレドキシン・レダクターゼによる化合物Aの還元作用を示す。50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA (pH 7.5)、100 μ M NADPH を含む溶液 0.55 ml を入れたキュベットに化合物A 10 μ M (●)、20 μ M (△)、50 μ M (□)、100 μ M (■) を添加した。TrxR 7.5 nM を上記4サンプルに添加した。時刻ゼロにおける化合物Aを含まないブランクの 340 nm での吸

光度の低下は、NADPH が $10\mu\text{M}$ の化合物Aで酸化されたことを示す。 $50\mu\text{M}$ 及び $100\mu\text{M}$ の化合物Aを含むキュベットは 340 nm での吸光度の増加を示した。また、可視的沈殿生成により NADPH の酸化反応が防止された。

図 2 B には、化合物Aをチオレドキシン・レダクターゼにより 10 分間還元した後の DTNB によるセレノール基生成の検出結果を示す。上記図 2 A と同様の実験を 10 分間反復した。 6 M グアニジン-HCl、 0.20 M Tris-HCl (pH 8.0)、 1 mM DTNB の混合液 0.5 ml を添加して反応を停止し、 412 nm での吸光度を測定し、ブランクを差し引いてセレノール基の定量を行った。化合物Aが最高濃度 ($50\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$) の時キュベットに沈殿が生じ、 6 M グアニジン HCl と DTNB で反応を停止した時、セレノール様物質がすべてのキュベットに認められたが (図 2 B)、NADPH の酸化と化合物Aのセレノールへの還元により生じる 340 nm 吸光度の低下は、明らかにこの沈殿により防止されていた。

NADPH と酵素による化合物Aの還元はイソセレナゾロン環が開環した結合中間体を経て、セレノールを生成する反応と考えられる (下記スキーム)。



この中間体と化合物Aとの反応、あるいは酵素に結合した中間体と化合物Aとの反応は溶解度の低いジセレニドを生成し、これが沈殿量を増加させ 340 nm 吸光度を高めるものと考えられる。化合物A $100\mu\text{M}$ と酵素を 4 nM しか含まない沈殿物の入ったキュベットに酵素 40 nM を加えると、このジセレニドはセレノールに還元されて溶液は急速に透明になり、最終的に NADPH 酸化反応が進行したことが

340 nm での吸光度変化として現れるが、この不溶性ジセレニドの生成はこの酵素だけに見られる特別な性質ではない。これは、化学量論的に解析できないような低い濃度 ($10\mu\text{M}$) の DTT と $100\mu\text{M}$ の化合物 A を用いた予備実験で示されたが、一方セレノールは過剰の DTT の存在下でのみ生成することが HPLC でも確認された。

化合物 A の K_m 値および V_{\max} 値を求めるため、5、10、 $20\mu\text{M}$ の化合物 A に対して 15 nM の酵素を用いた。30 秒後、すべてのキュベットで $5\mu\text{M}$ の NADPH が酸化された。その後、ジセレニドの還元を示すと思われる化合物 A の濃度上昇がゆっくり見られた。化合物 A の K_m 値が $5\mu\text{M}$ 未満であることは明らかであり、 1000 ± 300 / 分の Kcal 値が算出された。ヒト Trx- S_2 が 2.5 nM の K_m 値と 3000 / 分の Kcal 値を持つことを考えると、化合物 A は非常に珍しく効率のよい基質であると言える。

(b) 哺乳類チオレドキシンの酵素活性に及ぼす化合物 A の影響

化合物 A がチオレドキシンのレダクターゼの作用を阻害するか否かを調べるため、酵素定量試験を行なった。 $50\mu\text{M}$ 化合物 A と 10 nM 酵素と DTNB を基質として用いたところ、阻害は認められず、また、チオレドキシンのチオレドキシンのレダクターゼを用いたインスリン還元定量試験ではわずかな影響しか認められなかった (表 1)。後者の効果は、酵素と共に化合物 A がインスリンジスルフィドの還元反応の触媒作用をしないため、定量試験では Trx と競合することに由来する。化合物 A と共に酵素をプレインキュベーションすると NADPH の存在下又は非存在下で酵素作用は阻害されなかった。

表 1 に哺乳類チオレドキシンのレダクターゼの酵素活性に対する化合物 A の効果を示す。(A) は、100 nM リン酸カリウム (pH 7.0)、2 mM EDTA、0.2 mM NADPH、0.16 mM インスリン、 $5\mu\text{M}$ ヒト Trx 及び表示の化合物 A を混合した時の反応の結果を示す。10 nM 子牛胸腺由来のチオレドキシンのレダクターゼを総量 0.55 ml の上記混合液に添加して反応を開始し、340 nm での吸光度を 20°C で 3 分間測定した。その後、6 M グアニジン HCl、0.20 M Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM DTNB を含む混合液を 0.5 ml 加えて反応を停止し、412 nm での吸光度よりインスリン中に

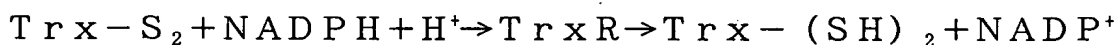
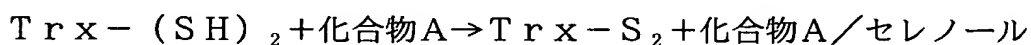
生成した SH 基の量を算出した。(B)では、10 nM 子ウシ胸腺由来のチオレドキシン・レダクターゼを 50 μ M の化合物 A 及び 100 μ M NADPH の存在下又は非存在下で 1 時間プレインキュベーションした。その後、この液 10 μ l を 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA、5 mM DTNB の混合液 500 μ l に加え、412 nm での活性を求めた。活性は 3 分間に生成した SH 基の量 (μ M) で示した。

表 1

	Trx で触媒されるインスリン ジスルフィドの還元			DTNB の還元	
化合物 A (μ M)	0	5	10	0	50
SH 基 (μ M)	79.8	70.6	68.4	7.3	7.5
活性(%)	100	89	88	100	103

(3)化合物 A の還元に及ぼすチオレドキシンの影響

チオレドキシン・レダクターゼ、NADPH、及び化合物 A にヒトチオレドキシンを加えると反応速度が上昇した。図 3 は、チオレドキシン・レダクターゼによる化合物 A の還元反応に対するヒトチオレドキシンの影響を示した図である。50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA (pH 7.5)、100 μ M NADPH を含む混合液 0.5 ml に 10 nM TrxR を加え、ヒト Trx-S₂ 添加量をゼロ (●)、5 μ M (◆) に変化させて NADPH の酸化反応の進行を記録した。最初の 2 分間には、Trx-S₂ は Trx-(SH)₂ へと還元された。矢印は両方のキュベットに化合物 A を添加したことを示す。この結果は、Trx-(SH)₂ が化合物 A を下記反応式に従って速やかに還元することを示している。



(4)化合物 A と大腸菌 Trx-(SH)₂ との反応

哺乳類と大腸菌の Trx は GPC という同じ活性部位を持ちジスルフィドとの反応性を有する。大腸菌の Trx-(SH)₂ は Trx-S₂ の 3 倍の強度のトリプトファン蛍光を発するので、これを化合物 A との反応を追跡するのに用いた。0.1 μ M の化合物 A と混合すると 0.1 μ M Trx-(SH)₂ から Trx-S₂ への酸化が起こったことを示すスベ

クトルの変化が認められた。図 4 A は、蛍光分光光度法による大腸菌 Trx-(SH)₂ の化合物 A による酸化を示した図である。N₂ 平衡 0.1 M リン酸カリウム液に大腸菌 Trx-(SH)₂ 0.1 μM (1.2 μg/ml) を加え、1 mM EDTA (pH 7.5) でサンプルを調製した。サンプルの蛍光は波長 290 nm で励起した。波長範囲 300~500 nm で吸光度を記録し、その後、0.1 μM の化合物 A を添加してスペクトルを記録した。図 4 B は 0.1 μM Trx-(SH)₂ と 0.1 μM の化合物 A を混合した後の 340 nm における蛍光発光の減衰率を示した図である。0.1 μM の化合物 A を添加後のデッドタイムに 0.1 μM の Trx-(SH)₂ の相対蛍光発光強度が変化することは、Trx-(SH)₂ の 2×10^7 /M/秒より酸化速度が速いことを示している。これは低分子量化合物による還元型チオレドキシンの酸化反応の中で最も速いものである。

(5) 化合物 A によるチオレドキシンのレダクターゼの過酸化水素レダクターゼ活性の増強

哺乳類のチオレドキシンのレダクターゼは過酸化水素を直接還元した。図 5 は、ヒトチオレドキシンのレダクターゼによる過酸化水素の還元と化合物 A 及びチオレドキシンの影響を示した図である。50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA (pH 7.5)、100 mM NADPH を含むキュベットに 0.5 mM 過酸化水素、17 nM ヒト TrxR (●)、17 nM ヒト TrxR + 2 μM 化合物 A (△)、17 nM TrxR + 2 μM 化合物 A + 4.5 μM ヒト Trx (□)。過酸化水素を含まない 17 nM チオレドキシンのレダクターゼだけのブランクの 340 nm での吸光度を測定した。この結果、0.50 mM のヒドロペルオキシドで 30 回/分の回転率と算定された。化合物 A 2 μM を添加することにより、この酵素の活性が刺激され、回転率が 15 倍、すなわち 450 回/分に増大した。さらに 4.5 μM のヒト Trx を加えると、活性は 30 倍、すなわち 900 回/分へと増大した。このように、化合物 A はチオレドキシンのレダクターゼの過酸化水素レダクターゼ活性（ペルオキシダーゼ活性）を劇的に増大させ、チオレドキシンのペルオキシダーゼ類似の作用を有することが明らかになった。

(6) 高濃度過酸化水素に対する化合物 A およびチオレドキシンの影響

チオレドキシンのレダクターゼ 17 nM にチオレドキシンを 4.5 μM 添加すると過

酸化水素の還元が促進される。図6はチオレドキシン・レダクターゼによる過酸化水素の還元反応に及ぼすチオレドキシンと化合物Aの影響を示した図である。図5と同様の条件で17 nM チオレドキシン・レダクターゼのみ (●)、4.5 μ M Trx 添加 (△) とし、その後 0.5 μ M の化合物Aを加えて最終的に化合物Aの濃度を5.5 μ M とした。低濃度 (0.5 μ M) の化合物Aは反応速度を上昇させ、5.5 μ M ではさらに強力な促進作用が認められた。過酸化水素 (2 mM)、TrxR (17 nM)、ヒト Trx (5 μ M) を用い、1、2、5 μ M の化合物Aを用いた場合には、同じ反応速度、すなわち 23 nM/分の NADPH 酸化速度を得た。このように、これらの条件下では酵素の回転率 1328 回/分、1 nM の化合物Aの回転率 23 回/分であり、非常に高い効率のペルオキシダーゼ系であることが判明した。

(7)低濃度過酸化水素に対する影響

化合物A 2 μ M では17 nM チオレドキシン・レダクターゼのみが100 μ M の過酸化水素に高い活性を示した。図7はTrxRの化合物Aへの活性に対する過酸化水素の濃度の影響を示した図である。17 nM ヒトチオレドキシン・レダクターゼ + 2 μ M 化合物A (●)、17 nM ヒトチオレドキシン・レダクターゼ + 4.5 μ M Trx + 2 μ M 化合物A (△) に表示の濃度の過酸化水素を添加して測定した。このように、化合物Aは生理的に有効な低い濃度でも酵素活性を向上させ、その増加率は約 25 倍であった。図8は、10 nM チオレドキシン・レダクターゼのみ (●)、又は10 nM チオレドキシン・レダクターゼ + 4.5 μ M ヒト Trx (△) のみを用いた場合における 100 μ M 過酸化水素の還元反応に対する化合物Aの影響を示している。活性は340 nmにおける吸光度の毎分当たりの変化率 ΔA_{340} /分で表示した。チオレドキシン依存反応はさらに促進されており、100 μ M 過酸化水素と1、2、5 μ M の化合物Aによって、Trxの存在下又は非存在下でも同じように反応が促進された。

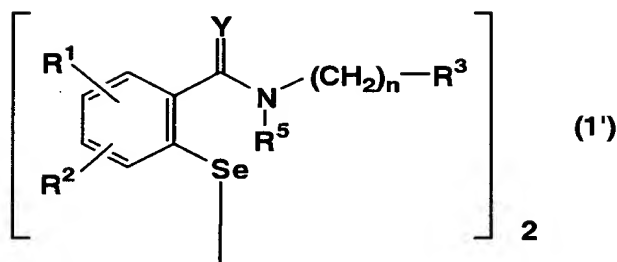
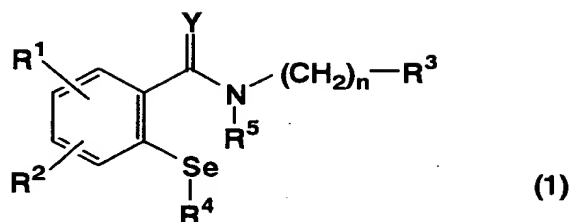
産業上の利用可能性

本発明のチオレドキシン・レダクターゼの基質は、チオレドキシンーチオレド

キシニン・レダクターゼ系を活性化でき、特にチオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性を増強することができる。従って、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシンを酸化することにより生体内物質の過酸化を防止する抗酸化剤などとして有用である。

請求の範囲

1. 以下の一般式 (I) 又は (I'):



(式中、 R^1 及び R^2 はそれぞれ独立に水素原子、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基、ニトロ基、炭素数 1~6 のアルキル基、又は炭素数 1~6 のアルコキシル基を示し、 R^1 及び R^2 が一緒になってメチレンジオキシ基を形成してもよく； R^3 はアリール基、芳香族複素環基、5~7 員のシクロアルキル基、又は 5~7 員のシクロアルケニル基を示し、該アリール基、該芳香族複素環基、該シクロアルキル基、及び該シクロアルケニル基は 1 個又は 2 個以上の置換基を有していてもよく； R^4 は水素原子、水酸基、-S-グルタチオン基、-S- α -アミノ酸基、又はアリール部分に 1 個又は 2 個以上の置換基を有していてもよいアルキル基を示し； R^5 は水素原子又は炭素数 1~6 のアルキル基を示し、 R^4 及び R^5 は一緒になって単結合を形成してもよく；Y は酸素原子又は硫黄原子を示し；n は 0~5 の整数を示し；セレン原子は酸化されていてもよい)

で表わされる化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含むチオレドキシン・レダク

ターゼ基質。

2. 2-フェニル-1,2-ベンゾイソセレナゾール-3(2H)-オン又はその開環体及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む請求の範囲第1項に記載のチオレドキシン・レダクターゼ基質。

3. NADPH の存在下でチオレドキシン・レダクターゼにより還元される請求の範囲第1項又は第2項に記載のチオレドキシン・レダクターゼ基質。

4. 請求の範囲第1項に記載の一般式 (I) 又は (I') で表される化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む、チオレドキシン・レダクターゼのベルオキシダーゼ活性の増強剤。

5. 2-フェニル-1,2-ベンゾイソセレナゾール-3(2H)-オン又はその開環体及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む、請求の範囲第4項に記載の活性増強剤。

6. 請求の範囲第1項に記載の一般式 (I) 又は (I') で表される化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む、チオレドキシン・レダクターゼのベルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシンを酸化する触媒。

7. 請求の範囲第1項に記載の一般式 (I) 又は (I') で表される化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む、チオレドキシン・レダクターゼのベルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシンを酸化することにより過酸化物を還元する作用を有する還元剤。

8. 請求の範囲第1項に記載の一般式 (I) 又は (I') で表される化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質を含む、チオレドキシン・レダクターゼのベルオキシダーゼ反応において還元型チオレドキシンを酸化することにより生体内物質の過酸化

を防止する抗酸化剤。

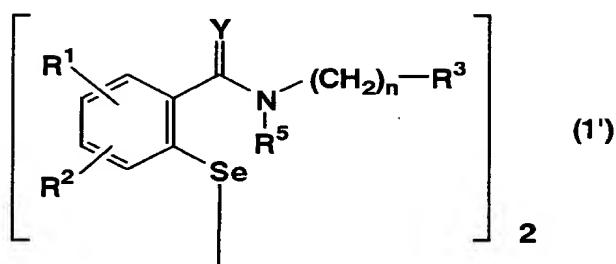
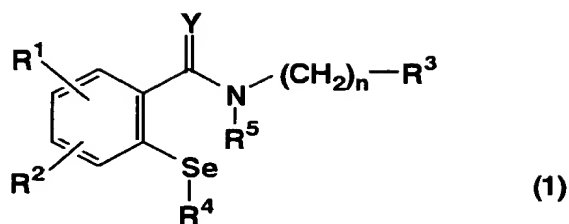
9. 生体内においてチオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性を増強する方法であって、請求の範囲第1項に記載の一般式(I)又は(I')で表される化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法。

10. 生体内において過酸化物を還元する方法であって、請求の範囲第1項に記載の一般式(I)又は(I')で表される化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法。

11. 生体内において生体内物質の過酸化を防止する方法であって、請求の範囲第1項に記載の一般式(I)又は(I')で表される化合物及び生理学的に許容し得るその塩、並びにそれらの水和物及びそれらの溶媒和物からなる群から選ばれる物質の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法。

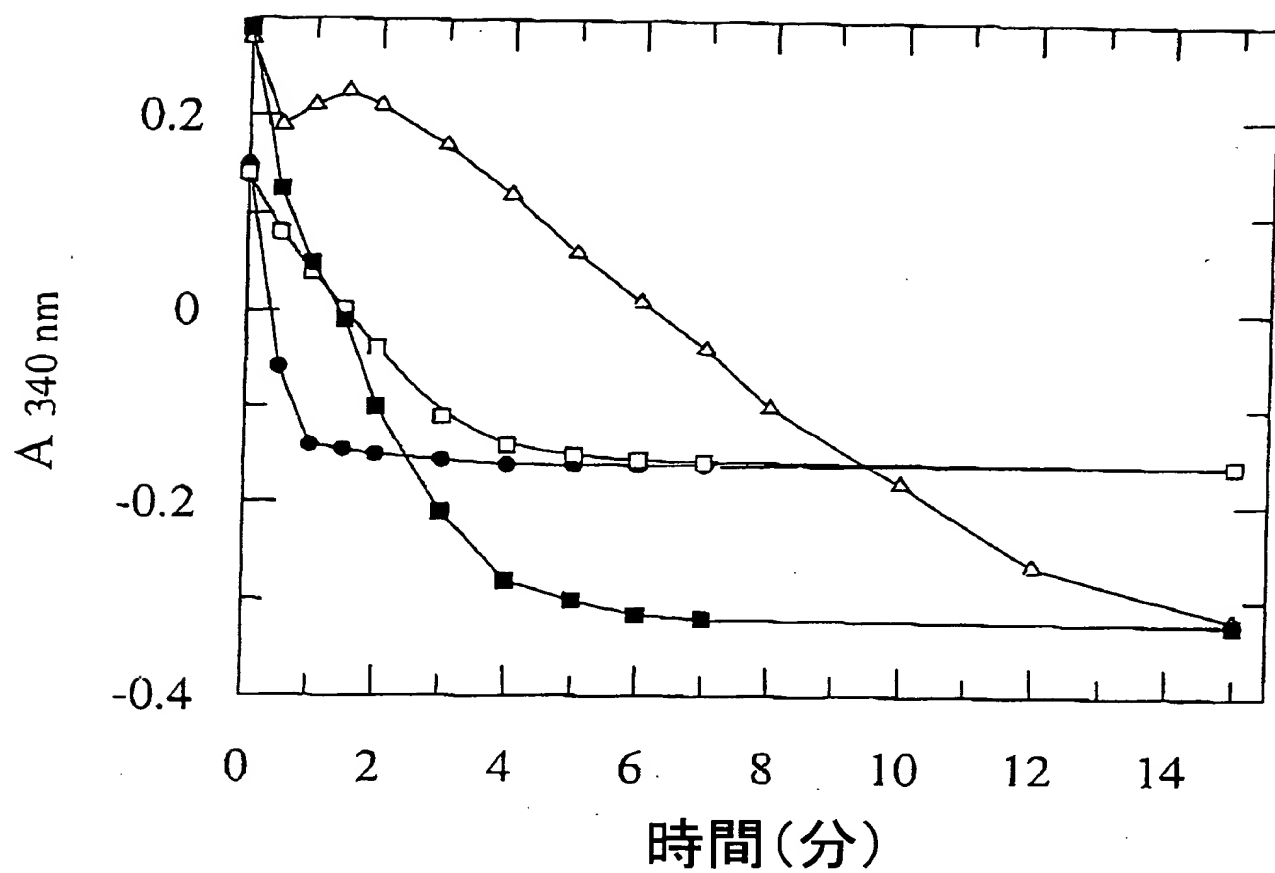
要 約 書

以下の一般式 (I) 又は (I') :

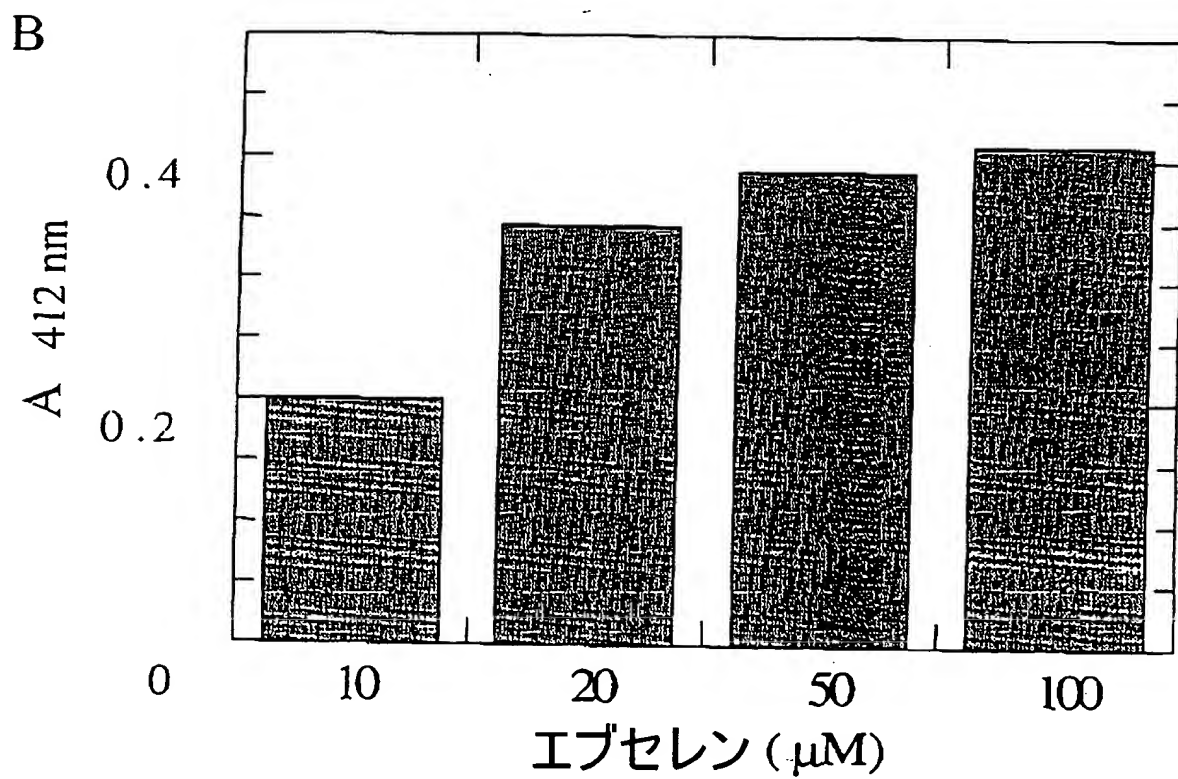
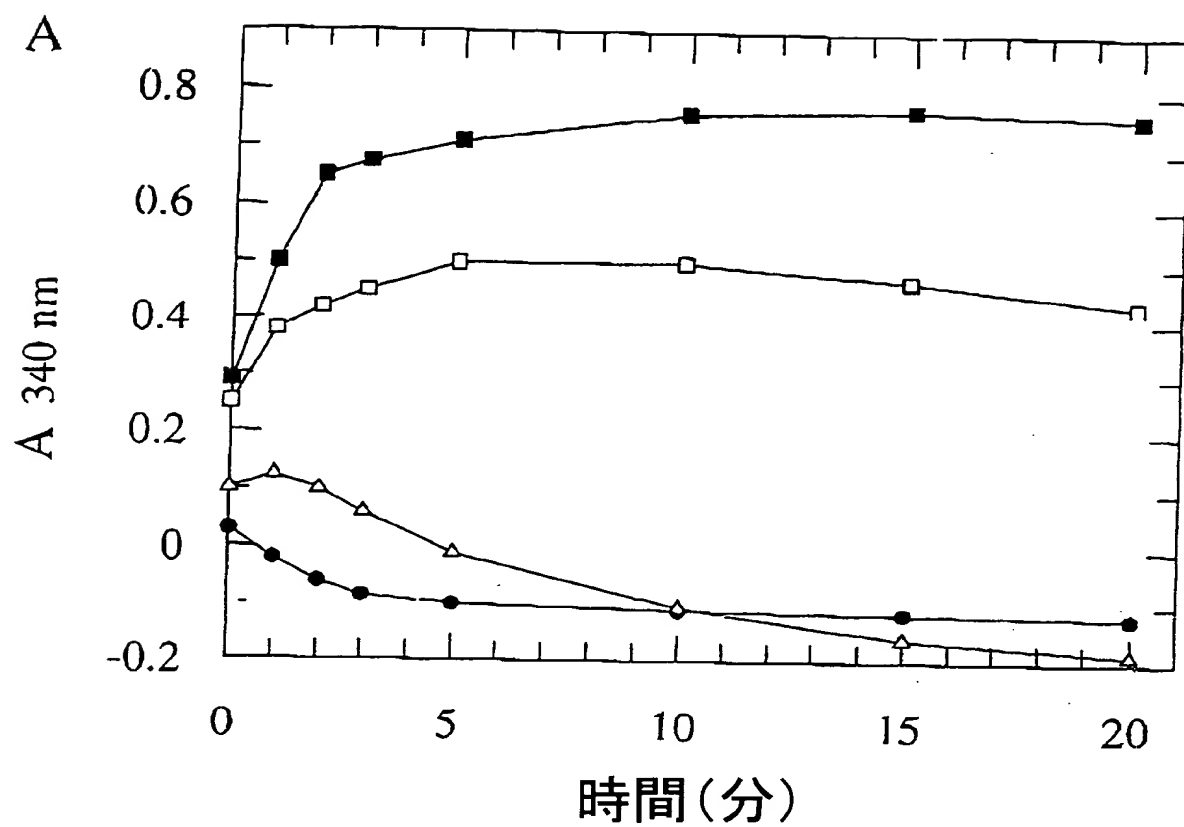


(R¹ 及び R² は水素原子、ハロゲン原子、トリフルオロメチル基などを示し ; R³ はアリール基、芳香族複素環基などを示し ; R⁴ は水素原子、水酸基、-S-α-アミノ酸基などを示し ; R⁵ は水素原子又は炭素数 1~6 のアルキル基を示し ; Y は酸素原子又は硫黄原子を示し ; n は 0~5 の整数を示し ; セレン原子は酸化されていてもよい) で表わされる化合物 (2-フェニル-1,2-ベンゾイソセレナゾール-3(2H)-オン又はその開環体など) を含むチオレドキシンレダクターゼ基質。NADPH の存在下でチオレドキシン・レダクターゼにより還元され、チオレドキシン・レダクターゼのペルオキシダーゼ活性を増強する。

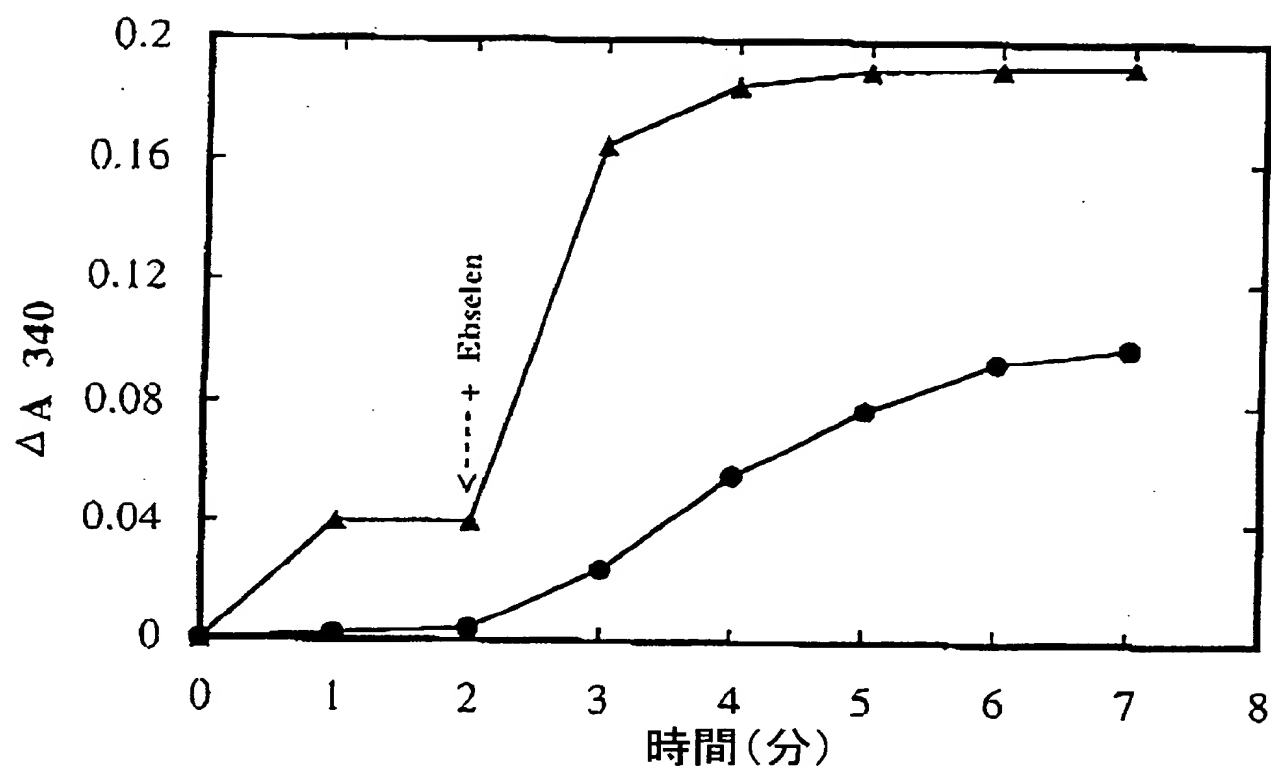
第1図



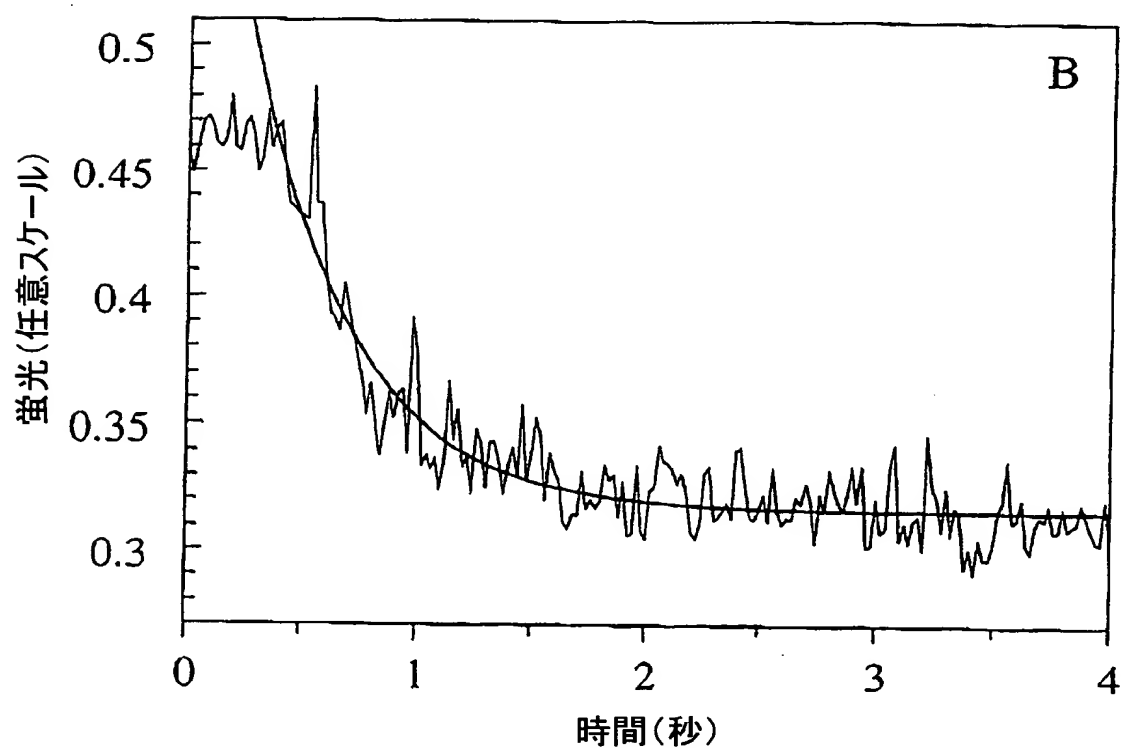
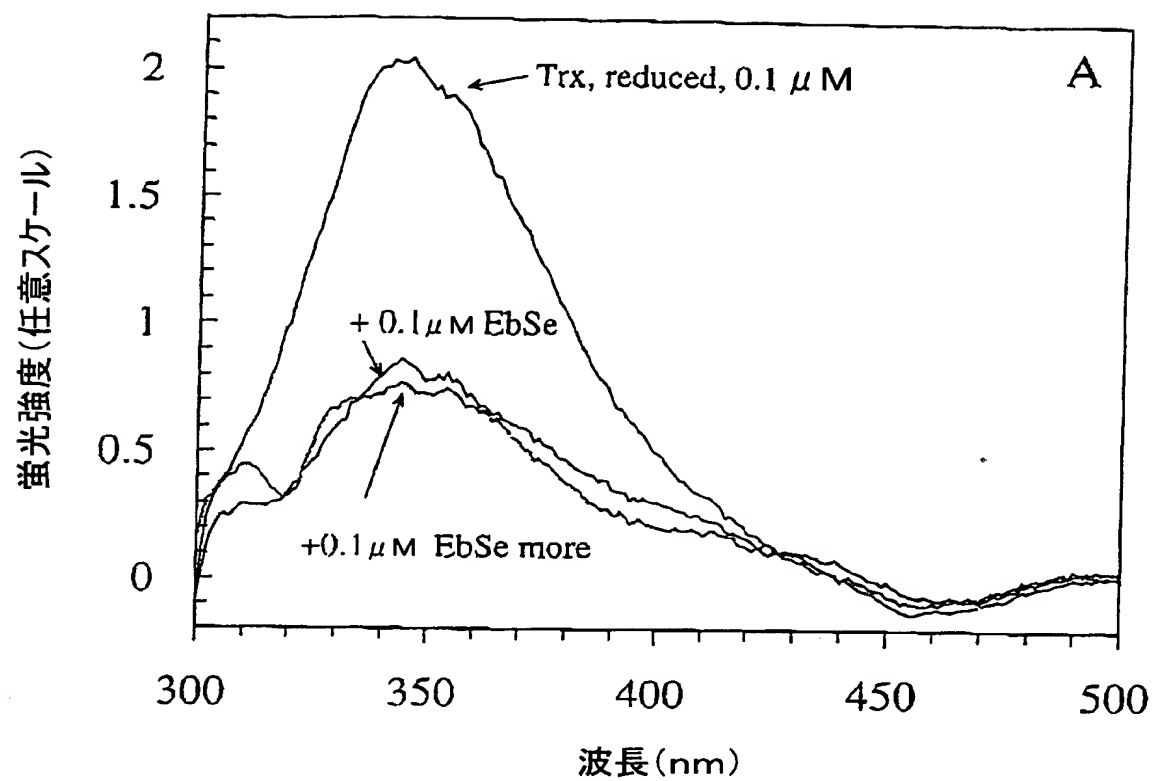
第2図



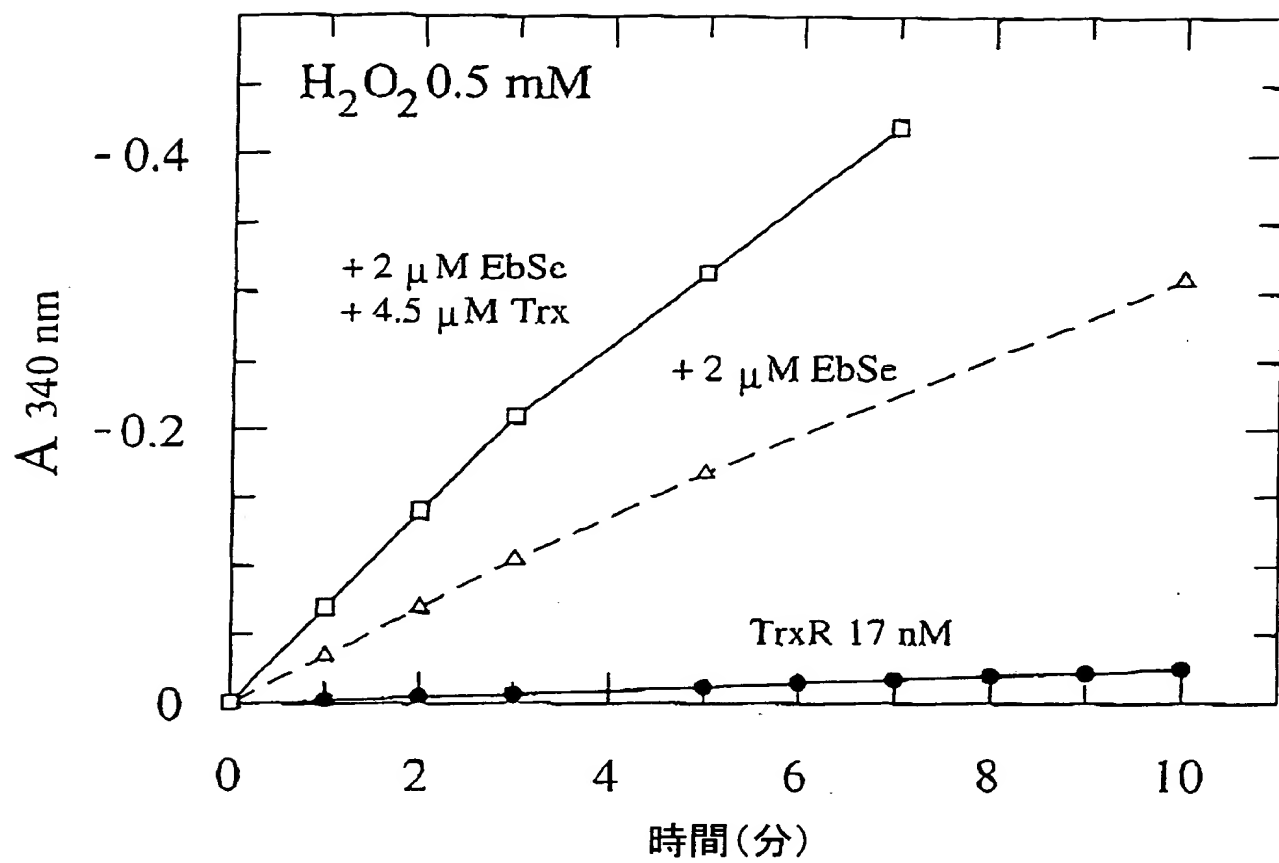
第3図



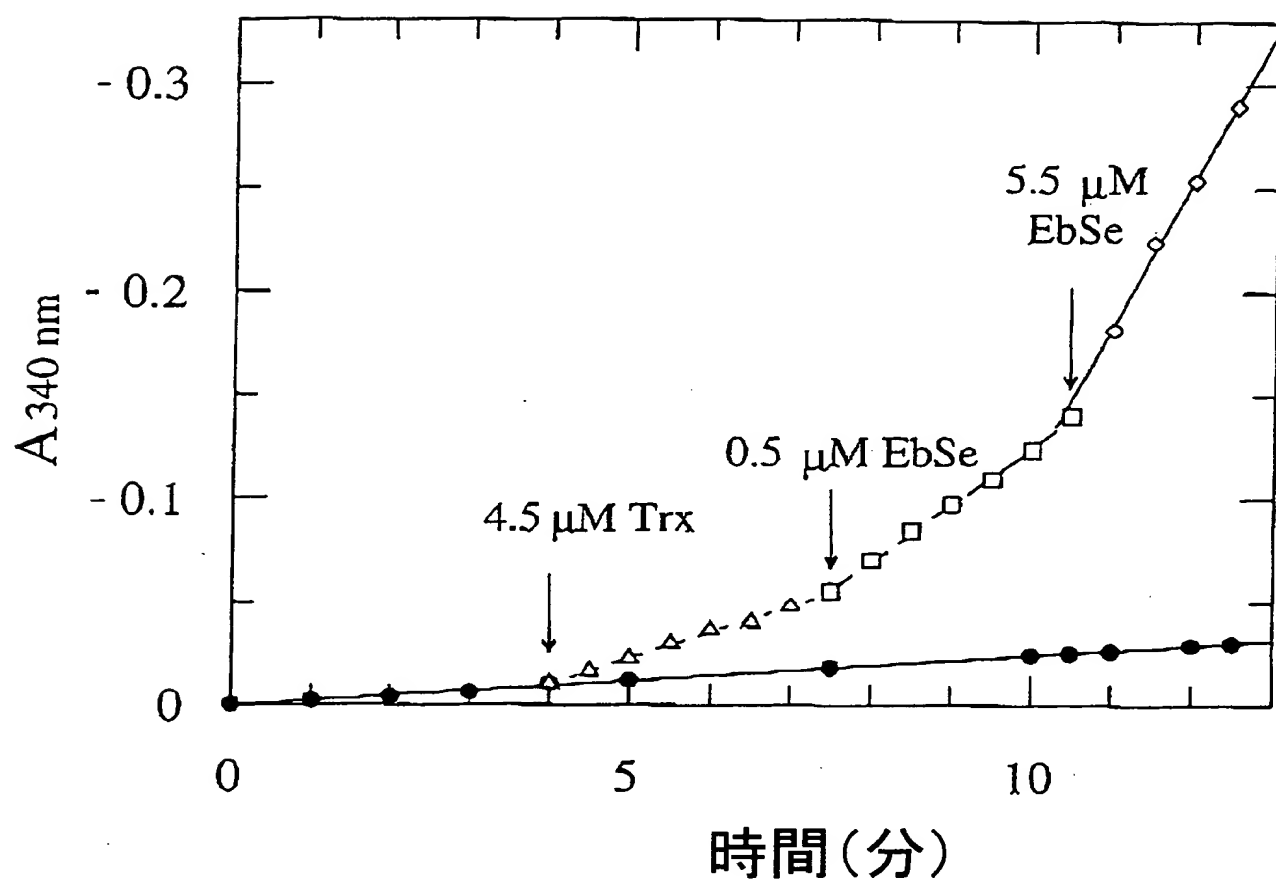
第4図



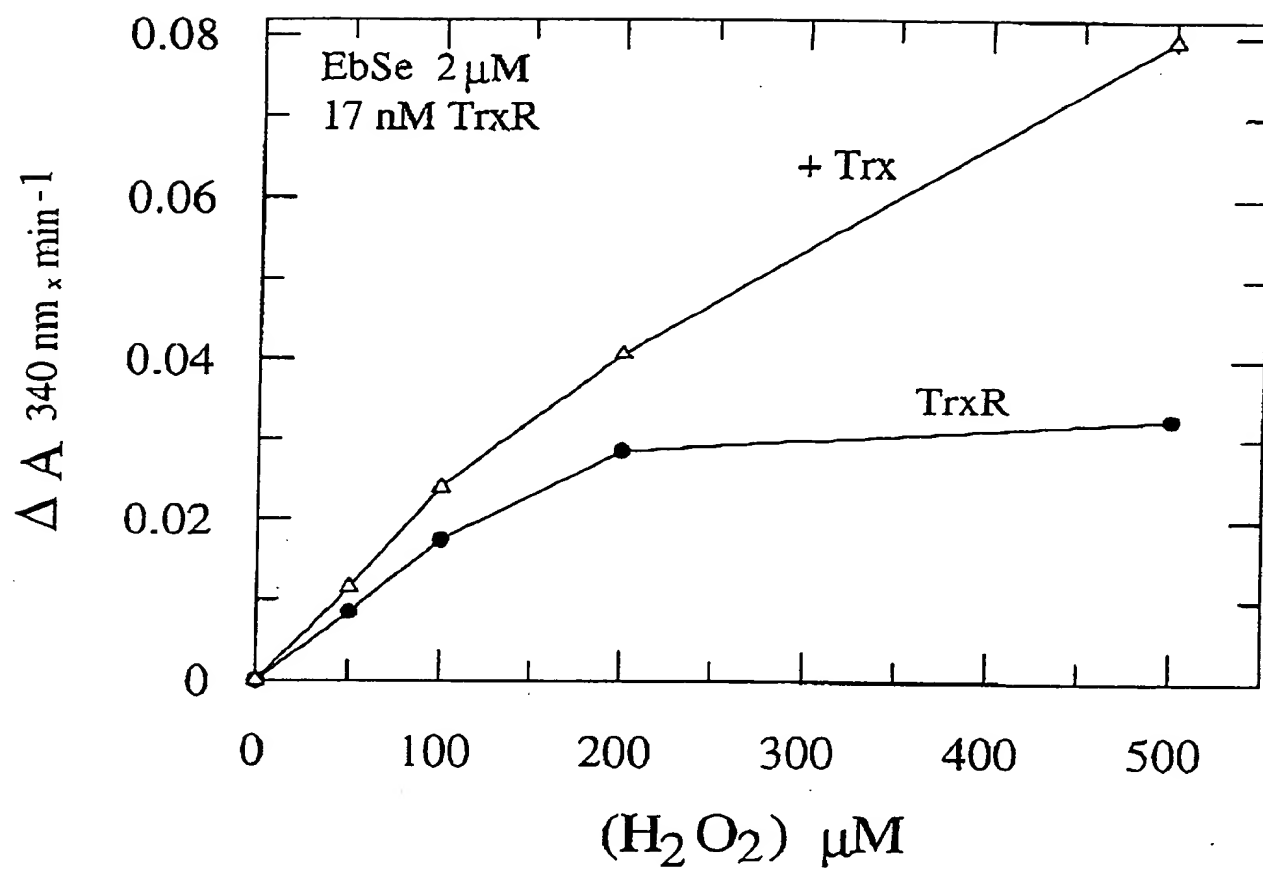
第5図



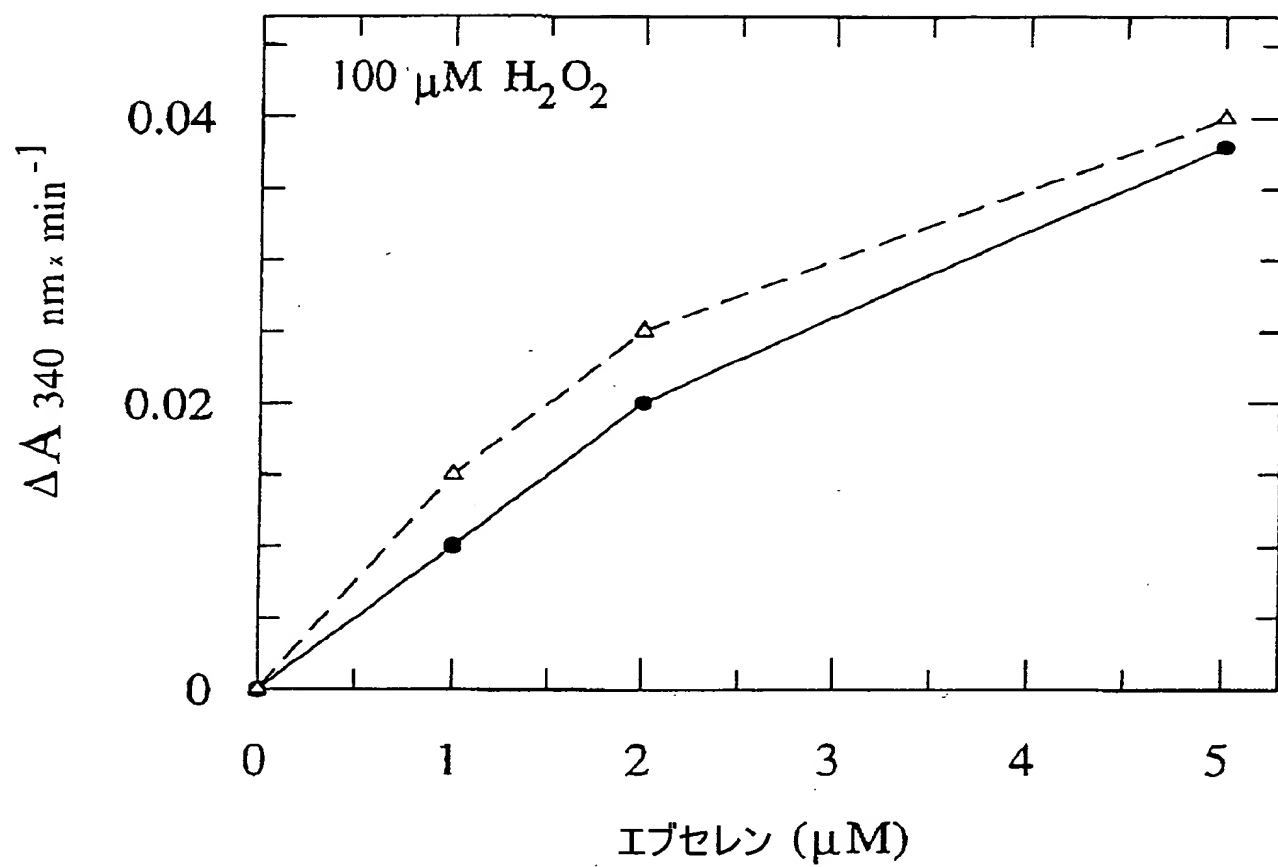
第 6 図



第7図



第8図



[Document Name] APPLICATION FOR PATENT

[Reference Number] P0365609

[Filing Date] September 1, 1994

[Filed to] Commissioner, Patent Office

[Title of the Invention] LIPOXYGENASE INHIBITOR

[Number of Claims] 8

[Inventor]
[Domicile or Residence] c/o DAIICHI PHARMACEUTICAL CO.,
LTD., Tokyo R&D CENTER,
16-13, Kitakasai 1-chome,
Edogawa-ku, Tokyo, Japan
[Name] Junji TANAKA

[Inventor]
[Domicile or Residence] c/o DAIICHI PHARMACEUTICAL CO.,
LTD., Tokyo R&D CENTER,
16-13, Kitakasai 1-chome,
Edogawa-ku, Tokyo, Japan
[Name] Hiroshi MASUMOTO

[Applicant for Patent]
[Identification Number] 000002831
[Name] DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
[Representative] Tadashi SUZUKI

[Agent]
[Identification Number] 100068700
[Patent Attorney]
[Name] ARUGA Mitsuyuki

[Agent]
[Identification Number] 100077562
[Patent Attorney]
[Name] TAKANO Toshio

[Agent]
[Identification Number] 100096736
[Patent Attorney]
[Name] NAKAJIMA Toshio

[Agent]
[Identification Number] 100101317
[Patent Attorney]
[Name] MATOBA Hiromi

[Priority Claimed Based on Prior Application]
[Application Number] 219854/1993
[Filing Date] September 3, 1993

[Priority Claimed Based on Prior Application]
[Application Number] 332338/1993
[Filing Date] December 27, 1993

6-208320

[Designation of Fees]

[Manner of Payment] Advance Payment

[Number of Advance Payment Register] 011752

[Amount Paid] 21,000Yen

[List of Appended Documents]

[Document Name] Specification 1

[Document Name] Abstract 1

[Request of Identification of Data] Requested

TITLE OF THE INVENTION

LIPOXYGENASE INHIBITOR

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention:

The present invention relates to a lipoxxygenase inhibitor, and more particularly to a lipoxxygenase inhibitor using as a therapeutic agent for preventing or treating diseases which are caused by lipoxxygenase metabolites, for example, cerebrovascular diseases such as cerebral ischemia and subarachnoid hemorrhage, cardiovascular diseases, bronchial asthma, tumors, inflammation, and endotoxin shock. And these are caused by inhibiting lipoxxygenase which is a oxxygenase acting on poly-unsaturated fatty acids.

Description of the Related Art:

Lipoxxygenase is an enzyme which acts on poly-unsaturated fatty acids such as linoleic acid, linolenic acid and arachidonic acid and produces hydroperoxides of them. When arachidonic acid is the substrate, it produces oxygenated and oxydized metabolites having a potent physiological activity, such as hydroperoxytetraenes and leukotrienes. These lipoxxygenase metabolites are known to have strong vasoconstriction action, vascular permeability promotion action, leukocytotactic action, tracheal

smooth muscle constriction action, accelerating action on the promotion of tumors and so on [M. A. Bray, Agents and Actions, 19 (1986), 87-89, B. Samuelson, Science, 220 (1983), 568-575, Satoshi Yamamoto, Nippon Yakurigaku Zasshi, 101 (1993), 349-361]. Moreover, it has been clarified that in various diseases lipoxxygenase is activated and the levels of metabolites produced are enhanced thereby causing diseases. Such diseases include cerebrovascular diseases such as cerebral infarction [R.J. Dempsy, et al., Neurol. Res., 8 (1986), 53-63] and subarachnoid hemorrhage [K.J. Kiwak, et al., J. Neurosurg., 62 (1985), 865-869], cardiovascular diseases [M. Carry, et al., Circulation, 85 (1992), 230-236], asthma [J. Rockach, "Leukotrienes and lipoxxygenase" by Elsevier, 1989], inhibition of tumor promotion [Satoshi Yamamoto, Nippon Yakurigaku Zasshi, 101 (1993), 349-361], inflammation [B. Samuelson, Science, 220 (1983), 568-575], and endotoxin shock [J.R. Parrat, In Handbook of Endotoxin, Vol. 2, 203-236 by Elsevier Science, 1985]. Accordingly, if metabolites of lipoxxygenase can be prevented increase in by inhibition of lipoxxygenase, injuries in the mentioned diseases could be improved. Moreover, since these diseases response well particularly in their acute phase, it has been considered that injection preparations would be very useful because they can quickly attain the effective drug concentration in blood after injection.

Accordingly, compounds which have a potent lipooxygenase inhibitory activity, which are safe and which can be prepared into medical preparations such as injection have been desired.

In view of the above, lipooxygenase inhibitors have been extensively researched, and so far, as a compound having a potent lipooxygenase inhibitory activity, 2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one (general name: ebselen) has been developed and clinically used [Peter Kuhl, et al., Prostaglandins, 31 (1986), 1029-1048]. However, this compound is only slightly soluble having a solubility of about 20 micromoles in water, therefore, it cannot be prepared for injections, and its sole use is directed to oral dosage forms.

Other compounds which have heretofore been developed as lipooxygenase inhibitors have left problems with regard to the safety such as production of methemoglobin, or have poor properties. In addition, drawbacks are accompanied in that bioavailability of the compounds is low, or they cannot be prepared into injections. There have been found no lipooxygenase inhibitors which are very safe, soluble in water, and have potent lipooxygenase inhibitory activity [R.M. McMillan et al., TIPS, 13 (1992), 322-330].

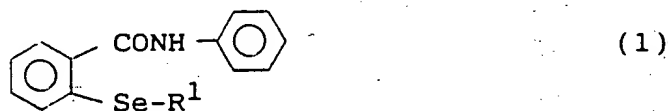
SUMMARY OF THE INVENTION

The object of the present invention is to provide a lipooxygenase inhibitor which has excellent lipooxygenase inhibitory activity, has a good solubility in water and

is very safe.

In order to achieve this object, we conducted studies of compounds with regard to their pharmacological activity, safety and solubility in water, and have found that the organo selenium compounds represented by the formula (1) to be described below and their salts have stronger lipooxygenase inhibitory activity than the aforementioned conventional compound ebselen, are soluble in water and are very safe, leading to completion of the invention.

Accordingly, the present invention provides a lipooxygenase inhibitor containing, as an active component, a selenium compound represented by the following formula (1) or a salt thereof:



wherein R¹ represents a cyclic alkylthio group, 2-amino-2-carboxyethylthiogroup or a group derived therefrom, a protein or peptide having a cysteine residue which links via a sulfur atom of the cysteine group, or a group R²-Se- in which R² represents a substituent group.

The above and other objects, features and advantages of the present invention will become apparent from the following description.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

AND PREFERRED EMBODIMENTS

Examples of the cyclic alkylthio group R^1 of the selenium compound represented by formula (1) which is an active component of the lipoxxygenase inhibitor of the present invention include a cyclic alkyl group having 3 to 8 carbon atoms. More specifically, mention may be given to a cyclopropylthio group, cyclobutylthio group, cyclopentylthio group, cyclohexylthio group, cycloheptylthio group, and cyclooctylthio group. Examples of the 2-amino-2-carboxyethylthio group and groups derived therefrom include those in which the thiol group of cysteine participates in bonding, 2-amino-2-alkoxycarbonylethylthio group (exemplary alkoxy groups in this group are led by an alkoxy group having 1 to 8 carbon atoms such as methoxy, ethoxy, propoxy, butoxy, pentyloxy, and hexyloxy), 2-acylamide-2-carboxyethylthio group (exemplary acyl groups in this group are led by an acyl group having 1 to 8 carbon atoms such as formyl, acetyl, propionyl, butyryl, and benzoyl), and 2-acylamide-2-alkoxycarbonylethylthio group (exemplary alkoxy groups and acyl groups in this group are those which are mentioned above). Examples of the peptide having a cysteine residue include L-cysteinyl glycine, glutathione, calcitonin and coenzyme A. Examples of proteins having a cysteine residue include various water-soluble proteins such as glutathione peroxidase, lactate dehydrogenase, and glucose-6-phosphate

dehydrogenase, albumin, etc. Examples of the albumin include human albumin, bovine albumin, etc., among which human serum albumin is preferred. Examples of the group represented by $R^2\text{-Se-}$ (R^2 represents a substituent group, and the term "substituent group" in the present specification means a substituent derived from an organic compound) include 2-phenylcarbamoyl-phenylselenyl group, 2-pyridine-3-yl-carbamoyl-phenylselenyl group, 2-phenylcarbamoyl-benzylselenyl group, 2-pyridine-3-yl-carbamoyl-benzylselenyl group, 3-phenylcarbamoyl-phenylselenyl group, 3-pyridine-3-yl-carbamoyl-phenylselenyl group, 3-phenylcarbamoyl-benzylselenyl group, 3-pyridine-3-yl-carbamoyl-benzylselenyl group, 4-phenylcarbamoyl-phenylselenyl group, 4-pyridine-3-yl-carbamoyl-phenylselenyl group, 4-phenylcarbamoyl-benzylselenyl group, and 4-pyridine-3-yl-carbamoyl-benzylselenyl group.

The phenyl groups in the above-mentioned phenylcarbamoyl groups may be substituted by various groups including alkyl groups having 1 to 8 carbon atoms, a hydroxy group, alkoxy groups having 1 to 8 carbon atoms such as methoxy groups, an amino group, a nitro group, and a carboxy group.

There is no particular limitation on the salt of the selenium compound (1) as long as it is physiologically acceptable. Illustrative examples include acid-addition salts such as hydrochlorides, sulfates, acetates, maleates, fumarates; and metal salts such as sodium salts, potassium

salts, calcium salts, zinc salts, lithium salts, aluminum salts, and iron salts.

The selenium compounds represented by formula (1) and salts thereof are known compounds, and can be synthesized according to a method described in H. Fischer and N. Dereu, Bull. Soc. Chim. Belg., 96 (1987), 757-768.

Among the selenium compounds of formula (1) and salts thereof, those where R^1 is S-albumin, S-glutathionyl or 2-phenylcarbamoyl-phenylselenyl are known to be metabolites of the aforementioned ebselen [H. Fischer et al., Xenobiotica 18 (1988), 1347-1359; H. Nomura et al., Selenium in Biology and Medicine (1989), 145-151].

These selenium compounds of formula (1) or salts thereof have excellent lipxygenase inhibitory activity, and their action is stronger than ebselen (IC_{50} = 20 to 30 micromoles) [Peter Kuhl, et al., Prostaglandins, 31 (1986), 1029-1048]. In particular, compounds of formula (1) having S-albumin as R^1 have a remarkably excellent lipxygenase inhibitory activity. Since it is a common knowledge that a drug, when combined with a protein, generally loses its pharmacological activity in greater or lesser degree [edited by Haruo Kitagawa, Teruhisa Noguchi and Ryuta Ito, "Metabolism of Drugs", published by Nankodo, Tokyo, (1971) p81-107; edited by Toshiro Murata, Ryuichi Arita, " Physiological Pharmacology published by Nankodo, Tokyo, (1975) p242-250; edited by Koichiro

Aoki, Toshio Takagi and Hiroshi Terada, "Plasma albumin - Their Roles in the Living Body" published by Kodansha Scientific, Tokyo, (1984), p131-160], it is quite surprising that they exhibit a stronger lipoxxygenase inhibitory action than ebselen.

Moreover, the selenium compounds of formula (1) and salts thereof are very safe, soluble in water and have good bioavailability.

Examples of diseases to which the lipoxxygenase inhibitors are applicable include cerebrovascular diseases such as cerebral infarction and subarachnoid hemorrhage, bronchial asthma, tumors, inflammation, and endotoxin shock.

Since the lipoxxygenase inhibitors of the present invention have favorable solubility in water and absorptivity upon administration as mentioned before, both oral and parenteral administrations are possible. In particular, intravenous administration is preferred. The inhibitors of the present invention may be formed into any physical forms such as tablets, capsules, powder, granule, syrup, injection solutions and so on. Upon manufacturing such preparations, ingredients, binders, disintegrants, solubilizers and so on may be incorporated.

The dose of the lipoxxygenase inhibitors according to the present invention depends on the condition, body weight, etc. of the patients in need thereof. It is generally from

0.05 to 1000 mg/day for adult when parenterally administered by way of injection or the like or orally administered. Preferably, it is from 30 to 300 mg/day in the case of oral administration, and from 10 to 100 mg/day in the case of parenteral administration. The inhibitors may be administered in a single dose, continual dose or in a divided dose, and a divided dose of twice to thrice a day is preferred.

EXAMPLES

The present invention will be described in detail by way of examples, which should not be construed as limiting the invention.

Example 1:

Synthesis of S-(2-phenylcarbamoyl-phenylseleno) bovine serum albumin:

Bovine serum albumin (fraction V, 2.4 g) was dissolved in 60 ml of distilled water to prepare a 4%w/v solution. 2-Phenyl-1,2-benzisoselenazole-3(2H)-one (20.1 mg) in 1 ml of dimethylformamide was added thereto portionwise and stirred. The solution was first turbid but soon turned to be transparent. The reaction solution was allowed to stand for 15 minutes at room temperature, and thereafter, applied onto a Sephadex G-25 gel filtration column (57.2 g, 4.5 cm in inner diameter, 15 cm high) equilibrated with distilled water. As a solvent for elution, distilled water was passed through the column, and protein fractions were

collected. Part of the protein fractions was taken and subjected to quantitative analysis of thiol group based on an Elleman reaction [Elleman, Arch. Biochem. Biophys., 82 (1959), 70-77]. As a result, the amount of thiol group was found to be under detection limit. The protein fractions were lyophilized in vacuo to obtain the target substance as white flakes (Yield: 2.22 g (92%)). An aliquot of the obtained flakes was dissolved in distilled water. The presence of thiol group was quantitatively analyzed in a similar manner as before. The amount of thiol group was found to be under detection limit.

The flakes obtained in the above process were dissolved in phosphate buffer (pH 7.4, 0.1 M) to make a 4%w/v solution, and dithiothreitol was added thereto so as to be 5 mM, followed by incubation at 37°C for 10 minutes. An aliquot of the reaction mixture was applied onto a Sephadex G-25 gel filtration column equilibrated with phosphate buffer. As a solvent for elution, phosphate buffer was passed through the column, and protein fractions were collected. Part of the protein fractions was taken and subjected to quantitative analysis of thiol group based on an Elleman reaction. As a result, almost the same amount of thiol group as detected when albumin of the same concentration is similarly treated was confirmed. This is due to the fact that the selenosulfide bond in S-(phenylcarbamoyl-

phenylseleno)-albumin is broken during a course of reduction to recover the thiol group of the protein.

Using 2-¹⁴C-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one uniformly labeled with a radioisotope ¹⁴C at the phenyl moiety thereof, S-(2-¹⁴C-phenylcarbamoyl-phenylseleno)-bovine serum albumin was prepared in a similar manner as described above. The prepared substance was dissolved in phosphate buffer to obtain a 4%w/v solution of the substance, to which dithiothreitol was added so as to be 10 mM, followed by incubation at 37°C for 1 hour. After cooling down the reaction solution to room temperature, 1.0 ml of the solution was taken, added with 1.0 ml of dextran-charcoal powder (100 ml of phosphate buffer in which 100 mg of Dextran T70 and 1.0 g of charcoal powder were suspended), stirred, and allowed to stand at room temperature for 1.5 hours. By this procedure, compounds liberated during the dithiothreitol treatment which correspond to 2-¹⁴C-phenylcarbamoyl-phenylselenol are adsorbed onto the activated charcoal. After the reaction solution was separated by centrifugation, radioactivity was scarcely detected in the supernatant protein solution. The same procedure was followed except that dithiothreitol was omitted. The radioactivity was hardly liberated and adsorbed onto the activated charcoal, thereby the radioactivity was left quantitatively in the protein solution.

Based on the above results, it is concluded that,

in the reaction between ebselen and bovine serum albumin, 2-phenylcarbamoyl-phenylseleno group is linked with the thiol group of albumin through the selenosulfide bond.

Example 2:

Measurement of lipoxxygenase inhibitory activity:

The lipoxxygenase inhibitory activity was measured according to a method reported by Holmann, R.T. with a slight modification [Methods of Biochemical Analysis, vol. II, 113 (1958)]. In detail, 10,000 units/ml of lipoxxygenase in 0.2 M borate buffer (pH 9.0) 0.05 ml was added with 0.95 ml a compound to be tested in the buffer (final conc. 0.1 to 200 micromoles/l). Further, 170 μ g/ml of linoleic acid in borate buffer 2.0 ml was added thereto as a substrate to initiate an enzymatic reaction. The lipoxxygenase inhibitory activity of each compound was determined by measuring the inhibition of rising of the absorption at 234 nm attributed to the peroxide products of linoleic acid produced by lipoxxygenase in a period of 1 to 3 minutes after the enzyme reaction was started. Control is such that compounds to be tested were eliminated from the reaction. Negative control was also provided, where lipoxxygenase was eliminated and only a solvent therefor was used. In addition, as a control for S-(2-phenylcarbamoyl-phenylseleno)-albumin, albumin of the

same concentration was provided for the measurement.

Moreover, 3,4-dihydroxycinnamic acid which is known to have lipoxygenase inhibitory activity [J. Rockach, "Leukotrienes and Lipoxygenase" by Elsvier, 1989] was subjected to the similar procedures of measurement to compare the activity.

The evaluation of the statistical significance was based on the t-test of Student/Welch.

The results are shown in Table 1. The values are expressed as mean value \pm SEM.

Table 1

Test Groups	Concentration (μ M)	Increase of absorp- tion (A_{234nm}) (%)	Number of Examples
Control group	—	100	5-6
Group containing no lipoxigenase	—	-2.1 \pm 0.8***	5
S-(2-Phenylcarbamoyl-phenylseleno)- cyclohexanethiol	1.0	92.1 \pm 2.4*	5
S-(2-Phenylcarbamoyl-phenylseleno)- cysteine	1.0 3.0 10.0	90.4 \pm 1.3** 65.6 \pm 1.6*** 32.6 \pm 2.6***	4 4 4
S-(2-Phenylcarbamoyl-phenylseleno)- glutathione	0.1 1.0	79.8 \pm 2.5* 76.3 \pm 4.1**	4 4
S-(2-Phenylcarbamoyl-phenylseleno)- bovine serum albumin	0.1 1.0	81.5 \pm 3.7* 56.5 \pm 3.3***	4 4
Bovine serum albumin	1.0	85.9 \pm 4.5	4
2-(2-Phenylcarbamoyl-phenylselenyl)- seleno-N-phenylbenzamide	0.1 1.0 10	95.7 \pm 3.7 88.0 \pm 4.8 73.9 \pm 4.8*	4 4 4
3,4-Dihydroxycinnamic acid	100 200	96.6 \pm 2.1 90.8 \pm 2.0**	5 5

***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ to control group

#: $p < 0.01$ to bovine serum albumin group

Example 3:

Synthesis of S-(2-phenylcarbamoyl-phenylseleno)-human serum albumin:

The procedure of Example 1 was repeated except that human serum albumin (product of Sigma, fraction V) was used instead of bovine serum albumin to prepare S-(2-phenylcarbamoyl-phenylseleno) human serum albumin.

Example 4:

Assay of lipoxxygenase inhibitory activity:

The procedure of Example 2 was mostly used to evaluate the lipoxxygenase inhibitory activity of S-(2-phenylcarbamoyl-phenylseleno) human serum albumin. The results are shown in Table 2.

As is apparent from Table 2, the lipoxxygenase inhibitory activity is concentration dependent. Also, lipoxxygenase activity was clearly observed at concentrations not higher than 0.1 micromoles.

Table 2

Concentration (micromoles)	Elevation (%) of absorption at 234 nm	No. of cases
0 (Control group)	100	5
0.095	61.3 \pm 1.42 (S.D.)***	4
0.29	53.2 \pm 4.16**	5
0.95	16.6 \pm 11.0***	5

***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ to control group

Example 5:

Evaluation of acute toxicity:

(1) Four 8 week-old male Wistar rats were provided for the test. Physiological saline containing S-(2-phenylcarbamoyl-phenylseleno)-bovine serum albumin was intravenously administered to the rats (1g/kg/3ml), and the rats were observed for 24 hours. Any condition proving adverse side effects was not noted, and all the rats survived until the lapse of 24 hours after the injection.

(2) Five male ddY mice (body weight: 36.2 to 46.9 g) were provided for the test. Physiological saline containing S-(2-phenylcarbamoyl-phenylseleno)-human serum albumin was intravenously administered to the mice (1g/kg/3ml), and the mice were observed for 48 hours. Any condition proving adverse side effects was not noted, and all the mice survived until the lapse of 48 hours after the injection.

As described above, the selenium compound of formula (1) and salts thereof have potent lipxygenase inhibitory activity, are very safe, and soluble in water. Therefore, they are useful for the prevention and the treatment of diseases in which metabolites of lipxygenase take part in the mechanism of the onset thereof, for example, cerebrovascular diseases such as cerebral infarction and subarachnoid hemorrhage, ischemic heart diseases, bronchial asthma, tumors, inflammation, and endotoxin shock by oral or parenteral administration.

What is Claimed is:

1. A lipooxygenase inhibitor containing as an active component a selenium compound represented by the following formula (1) or a salt thereof:



wherein R¹ represents a cyclic alkylthio group, 2-amino-2-carboxyethylthio group or a group derived therefrom, a protein or peptide having a cysteine residue which links via a sulfur atom of the cysteine group, or a group R²-Se- in which R² represents a substituent group.

2. The lipooxygenase inhibitor according to Claim 1, wherein the group R²-Se- is selected from the group consisting of 2-phenylcarbamoyl-phenylselenenyl group, 2-pyridine-3-yl-carbamoyl-phenylselenenyl group, 2-phenylcarbamoyl-benzylselenenyl group, 2-pyridine-3-yl-carbamoyl-benzylselenenyl group, 3-phenylcarbamoyl-phenylselenenyl group, 3-pyridine-3-yl-carbamoyl-phenylselenenyl group, 3-phenylcarbamoyl-benzylselenenyl group, 3-pyridine-3-yl-carbamoyl-benzylselenenyl group, 4-phenylcarbamoyl-phenylselenenyl group, 4-pyridine-3-yl-carbamoyl-phenylselenenyl group, 4-phenylcarbamoyl-benzylselenenyl group and 4-pyridine-3-yl-carbamoyl-benzylselenenyl group; wherein the phenyl group of the phenylcarbamoyl group of each of these groups may

have a substituent.

3. The lipoxxygenase inhibitor according to Claim 1, wherein the selenium compound is S-(2-phenylcarbamoyl-phenylseleno)-albumin.

4. The lipoxxygenase inhibitor according to Claim 1, wherein the selenium compound is S-(2-phenylcarbamoyl-phenylseleno)-human albumin.

5. The lipoxxygenase inhibitor according to Claim 1, wherein the selenium compound is S-(2-phenylcarbamoyl-phenylseleno)-human serum albumin.

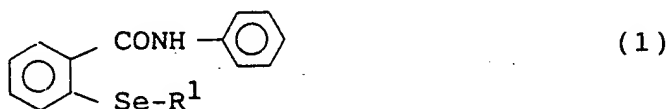
6. The lipoxxygenase inhibitor according to Claim 1, wherein the selenium compound is 2-(2-phenylcarbamoyl-phenylselenyl)-seleno-N-phenylbenzamide.

7. The lipoxxygenase inhibitor according to Claim 1, wherein the selenium compound is S-(2-phenylcarbamoyl-phenylseleno)-cysteine.

8. The lipoxxygenase inhibitor according to Claim 1, wherein the selenium compound is S-(2-phenylcarbamoyl-phenylseleno)-glutathione.

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

A lipoxygenase inhibitor containing, as an active component, a selenium compound represented by formula (1) or salts thereof:



wherein R¹ represents a cyclic alkylthio group, 2-amino-2-carboxyethylthio group or a group derived therefrom, a protein or peptide having a cysteine residue which links via a sulfur atom of the cysteine group, or a group R²-Se- in which R² represents a substituent group.

The selenium compound of formula (1) and salts thereof have potent lipoxygenase inhibitory activity, are very safe, and soluble in water. Therefore, they are useful for the prevention and the treatment of diseases in which metabolites of lipoxygenase take part in the mechanism of the onset thereof by oral or parenteral administration.

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 30 MAR 2001

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 A01112M	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/02076	国際出願日 (日.月.年) 31.03.00	優先日 (日.月.年) 31.03.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ C07C391/02, A61K31/166, A61P39/06, B01J31/12, C07B31/00, C09K15/32, C12N9/00, C12N9/04		
出願人 (氏名又は名称) 第一製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 31.03.00	国際予備審査報告を作成した日 14.03.01		
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 前 田 憲 彦 印	4 H	8 3 1 8
電話番号 03-3581-1101 内線 3443			

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告 において「出願時」とし、本報告 には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
☐ 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
☐ 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	4-11	有
	請求の範囲	1-3	無
進歩性(1S)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-11	無
産業上の利用可能性(1A)	請求の範囲	1-11	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

- 文献1. Gavin E ARTEEL et al. "Function of Thioredoxin Reductase as a Peroxynitrite Reductase Using Selenocystine or Ebselen",
Chem. Res. Toxicol., 1999, 第12巻, 第3号, p. 264-269
- 文献2. US, 4618669, A(A. Nattermann & Cie GmbH) 21. 10月. 1986(21. 10. 86) 第1-6欄
- 文献3. US, 4730053, A(A. Nattermann & Cie GmbH) 8. 3月. 1988(08. 03. 88) 第1-6欄

請求の範囲1-3について

国際調査報告で示した文献1により新規性を有しない。
文献1には有機セレン化合物がチオレドキシンレダクターゼの基質として用いられることが記載されている。

請求の範囲1-11について

国際調査報告で示した文献1により進歩性を有しない。
文献1には有機セレン化合物がチオレドキシンレダクターゼの活性を促進することが記載されているから、ペルオキシダーゼ活性の増強剤として用いることは当業者が容易になし得る。

請求の範囲10-11について

国際調査報告で示した文献2及び文献3により進歩性を有しない。
文献2及び3には有機セレン化合物が過酸化物の還元に作用することが記載されているから、当該化合物を生体内の還元又は過酸化防止に用いることは当業者が容易になし得る。